

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Prof. Dr. med. Marcus Altfeld

## **Die Rolle von CD73 für die Funktion und Entwicklung von B-Lymphozyten**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Felix Lothar Michael Scherg  
aus Aschaffenburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 29.08.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Haag**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Fragestellung</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 B-Lymphozyten</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1.1 B-Zell-Entwicklung im Knochenmark</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1.2 Transitionale B-Zellen</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1.3 Marginalzonen-B-Zellen</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1.4 Entwicklung von folliculären B-Zellen und Keimzentrumsreaktion</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1.5 Aus Aktivierung resultierende Populationen</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1.6 Gedächtnis-B-Zellen</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.6.1 Subpopulationen von B-Gedächtniszellen</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.6.2 IgM+IgD+ Memory Zellen</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1.6.3 Plasmablasten und Plasmazellen</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Extrazelluläres ATP als Gefahrensignal</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Probenbeschaffung</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Immunphänotypische Analyse und intrazelluläre Färbung</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Grundprinzip der Durchflusszytometrie</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4 Statistische Analyse</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 T-SNE</b> .....	<b>20</b>
<b>3.6 SPADE</b> .....	<b>21</b>
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>

<b>4.1 Architektur und Anwendung des erarbeiteten B-Zell Panels .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Der Anteil von CD19<sup>+</sup> B-Zellen an Lymphozyten im peripheren Blut fällt mit zunehmendem Alter ab .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Die CD73 Expression von B-Lymphozyten variiert je nach Differenzierungsgrad.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Die Analyse der CD73 Expression transistionaler B-Zellen deckt eine dritte Subpopulation transistionaler B-Zellen (T3) auf .....</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Die Expression von CD73 verändert sich mit dem Lebensalter .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Infektionen mit dem HI-Virus wirken sich auf die CD73 Expression und die Zusammensetzung der B-Zell Populationen aus.....</b>	<b>37</b>
<b>4.7 CVID Patienten zeigen Veränderungen in der Zusammensetzung ihres B-Zell Pools mit verminderter CD73 Expression der Zellen.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Die Zusammensetzung der B-Zell Population im peripheren Blut verändert sich mit dem Lebensalter .....</b>	<b>43</b>
<b>4.9 Der Anteil an CD21<sup>low</sup> Zellen nimmt mit steigendem Lebensalter zu.....</b>	<b>46</b>
<b>4.10 Plasmablasten machen altersunabhängig nur einen geringen Anteil der B-Zellen im peripheren Blut aus .....</b>	<b>47</b>
<b>4.11 Der Algorithmus tSNE findet ähnliche B-Zell Populationen wie das subjektive Gating.....</b>	<b>48</b>
<b>4.12 SPADE deckt signifikante Unterschiede zwischen gesunden Spendern und antiretroviral therapierten HIV Patienten auf.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Einschränkungen der durchgeführten Analyse .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Das erarbeitete FACS Panel erlaubte die Identifikation unterschiedlicher relevanter B-Zell Subpopulationen .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3 Das Alter von Patienten hatte Einfluss auf CD73 Expression und Verteilung der unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen.....</b>	<b>56</b>
<b>5.4 Die CD73 Expression von B-Zellen hängt von ihrem Differenzierungsgrad ab.....</b>	<b>57</b>

<b>5.5 Die Analyse der CD73 Expression transitionaler B-Zellen deckte eine dritte Population transitionaler B-Zellen auf .....</b>	<b>58</b>
<b>5.7 Die Analyse von B-Zellen von COVID Patienten zeigte eine signifikant verminderte CD73 Expression und signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des B-Zell Pools der Patienten auf.....</b>	<b>61</b>
<b>5.8 B-Zellen von HIV Patienten zeigen eine veränderte Zusammensetzung und exprimieren signifikant weniger CD73 als gesunde Spender .....</b>	<b>61</b>
<b>5.9 Der mit SPADE erstellte minimale Spannbaum zeichnet die B-Zell Differenzierung nach .....</b>	<b>64</b>
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>76</b>
<b>10.1 Zusätzliche Abbildungen.....</b>	<b>76</b>
<b>11. Danksagung und Widmung.....</b>	<b>77</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>78</b>
<b>13. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>79</b>

## **1. Fragestellung**

Das immundiagnostische Labor am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf erhält pro Jahr in etwa 150 Anfragen zur phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen in Proben peripheren Blutes von Patienten. Da neben Anfragen aus Ambulanzen und Stationen für erwachsene Patienten auch Anfragen aus der Immundefekt Ambulanz der Kinder- und Jugendmedizin kommen, handelt es sich um eine breit gefächerte Patientenkohorte, die Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen umfasst. Die Anschaffung eines neuen Gerätes für FACS Analysen Ende des Jahres 2015 im Zentrum für Diagnostik eröffnete die Möglichkeit der Erarbeitung eines neuen FACS Panels zur Analyse von B-Zell Subpopulationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein neues B-Zell Panel etabliert, welches neben Antigenen zur Identifikation unterschiedlichster B-Zell Subpopulationen auch das Antigen CD73 einschließt, welches wahrscheinlich eine wichtige, aber noch nicht genau definierte Rolle in der Differenzierung von B-Zellen spielt. Inzwischen wurden mehr als 280 Blutproben von Patienten und gesunden Spendern analysiert. Dieser Datensatz soll nun genutzt werden, um die Rolle von CD73 für die Funktion und Entwicklung von B-Lymphozyten zu untersuchen. Hierzu wird eine detaillierte Analyse der CD73 Expression und der Verteilung der verschiedenen B-Zell Subpopulationen im peripheren Blut von Patienten durchgeführt. Außerdem soll ein Vergleich verschiedener Patientenkohorten mit Proben von gesunden Blutspendern erfolgen.

## **2. Einleitung**

### **2.1 B-Lymphozyten**

Etwa eine Billion Zellen des gesunden menschlichen Körpers sind B-Zellen, die sich in ihrem Differenzierungsgrad und Aufgaben stark unterscheiden (nach Melchers 2015).

Mit Hilfe ihrer Antikörper sind B-Zellen dazu in der Lage Antigene von Krankheitserregern zu erkennen. Dieser Prozess führt mit der Unterstützung von T-Zellen zur Aktivierung und Ausdifferenzierung der Zellen, die nun als Plasmazellen hochaffine und spezifische Antikörper gegen das Antigen des Erregers produzieren und sezernieren. Diese Antikörper vermitteln nicht nur die Abwehr des entsprechenden Erregers, sie tragen auch gemeinsam mit entstandenen Gedächtniszellen zur Langzeitimmunität bei (nach Murphy et al. 2016).

Antikörper sind also das zentrale Element der Funktionalität von B-Zellen. Sowohl in gelöster als auch in membrangebundener Form setzen sich Antikörper aus sog. schweren (H-Ketten) und leichten Ketten (L-Ketten) zusammen. Innerhalb des B-Zell Genoms kodieren bestimmte Regionen (Abschnitte) für diese Antikörper Ketten. Zu diesen Abschnitten gehören neben der H-Region, die für die schwere Kette kodiert, auch die lambda- und kappa-Regionen, die jeweils für äquivalente leichte Ketten kodieren. Die genannten Regionen können weiter unterteilt werden. So bestimmt beispielsweise der Aufbau der konstanten Region (C-Region) der schweren Kette über die spätere Antikörperklasse. Es gibt insgesamt fünf Antikörperklassen: Immunglobulin M, D, A, G und E, von denen jede unterschiedliche Eigenschaften hat, die der Abwehr bestimmter Gruppen von Erregern dienen. Im Zuge ihrer Entwicklung exprimieren alle B-Zellen Antikörper der Klasse M (IgM) und eine durch alternatives Spleißen entstehende Klasse D (IgD). Erst durch Aktivierung und weitere Differenzierung kommt es in einem Teil der aktivierten Zellen zum sog. Isotypenwechsel, bei dem sich die Antikörperklasse unumkehrbar zu IgA, IgG oder IgE ändert. Dieser Isotypen- oder auch Klassenwechsel genannte Prozess wird im Abschnitt ‚Keimzentrumsreaktion‘ genauer thematisiert (nach Murphy et al. 2016).

### **2.1.1 B-Zell-Entwicklung im Knochenmark**

Um die Zusammensetzung des humanen B-Zell Pools verstehen zu können, muss die B-Zell Entwicklung genauer betrachtet werden. Die Entwicklung der Blutzellen findet bei Feten in der Leber und bei Erwachsenen im Knochenmark statt. B-Zellen stammen von den dort befindlichen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (pHSZs) ab. pHSZs sind selbsterneuernde Zellen, die in alle Linien von Blutzellen differenzieren können (pluripotent). Unter dem Einfluss unterschiedlicher Chemokine und Zytokine gehen aus pHSZ multipotente myeloid/lymphoide Progenitorzellen (MPPs) hervor. MPPs teilen sich und differenzieren unter dem Einfluss des dortigen Mikroumfelds zu gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors, CLPs). CLPs können anders als MPP nur noch lymphoide (T-Zellen, B-Zellen) und keine myeloiden Zellen (Monozyten, Granulozyten,...) mehr hervorbringen. Aus CLP gehen nun Progenitor B-Zellen hervor (pro-B), die beginnen ihre Immunglobulin- (Antikörper-) Gensegmente zu reorganisieren (nach Melchers 2015).

Der Umlagerungsprozess der Immunglobulin-Gensegmente innerhalb des B-Zell Genoms ist das zentrale Element der B-Zell Entwicklung. Dieser Prozess schafft die Grundlage für die

spätere Vielfalt der von B-Zellen produzierten Antikörper. Pro-B Zellen ordnen D- und J-Segmente der schweren Ketten von Antikörpern um und verbinden diese mit der variablen Region (V-Region). Damit beginnt die prä-B-Zell Phase (nach Pieper et al. 2013).

Die sog. großen prä-B-Zellen verfügen nun über reorganisierte VDJ Segmente der schweren Ketten, welche nun gemeinsam mit einer Ersatz-Leichtkette als prä-B-Zell Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert werden. Nach drei bis fünf Zellteilungen differenzieren große prä-B-Zellen zu kleinen prä-B-Zellen. Kleine prä-B-Zellen reorganisieren nun auch die V- und J-Gen-Segmente ihrer Leichtketten Antikörper (nach Murphy et al. 2016). Nachdem dieser Prozess abgeschlossen ist, exprimieren die B-Zellen den reifen B-Zell Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der aus einem membrangebunden Antikörper der Immunglobulin Klasse M (IgM) besteht (nach Pieper et al. 2013). Diese IgM exprimierenden B-Zellen werden als unreife B-Zellen bezeichnet (nach Pieper et al. 2013). Durch alternatives Spleißen der Immunglobulin-Proteine exprimieren die Zellen nach weiterer Differenzierung auch Antikörper der Klasse D (IgD) auf der Oberfläche (nach Pieper et al. 2013; nach Murphy et al. 2016).

Im Knochenmark werden den B-Zellen durch Zellen in der Umgebung Auto-Antigene präsentiert. Zellen die stark an Auto-Antigene binden werden in den Zelltod getrieben, während Zellen, die keine Auto-Antigene binden, das Knochenmark verlassen, um Teil des konventionellen B-Zell Pools zu werden. Dieser Selektionsmechanismus dient der Selektion nicht-autoreaktiver B-Zellen (nach Melchers 2015).

### 2.1.2 Transitionale B-Zellen

Die unreifen Zellen zirkulieren nun als sogenannte transitionale Zellen (TransB) im Blut. Im Gegensatz zu reifen Zellen exprimieren TransB neben IgD und IgM auch CD24 und CD38 in hoher Intensität (Cuss et al. 2006; nach Carsetti et al. 2004). TransB können anhand ihrer CD21 Expression weiter in CD21-niedrig exprimierende T1-Zellen (T1) und CD21-hoch exprimierende T2-Zellen (T2) unterteilt werden, was aufeinanderfolgende Stufen der Reifung

CD24 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das von unreifen B-Zellen exprimiert wird. Es handelt sich um das mögliche Korrelat zum ‚hitestabilen Antigen‘ von Mäusen im Menschen (nach Murphy et al. 2016).

Die zyklische ADP Ribose Hydrolase - CD38 - spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (Calcium-abhängige-Signalübertragung) und wird von unreifen und höher differenzierten B-Zellen (Keimzentrums-B-Zellen und Plasmablasten) exprimiert (nach Murphy et al. 2016).

widerspiegelt (Sims et al. 2005; Suryani et al. 2009). Beide Populationen können im peripheren Blut als kleiner Anteil der B-Zellen gefunden werden (nach Carsetti et al. 2004).

TransB wandern anschließend in die Milz ein, wo sie sich entweder zu Marginalzonen-B-Zellen (MZ-B-Zellen) oder zu follikulären B-Zellen (FoB-B-Zellen) entwickeln (nach Pieper et al. 2013).

### **2.1.3 Marginalzonen-B-Zellen**

MZ-B-Zellen finden sich im weißen Mark der Milz. Diese Zellen ähneln ruhenden reifen B-Zellen, exprimieren aber andere Proteine auf ihrer Oberfläche als diese. So exprimieren sie beispielsweise CD23 in geringerem und CD21 in höherem Maße. Die Hauptaufgabe dieser Zellen liegt in der Abwehr von Bakterien, die ins Blut übergetreten sind (nach Murphy et al. 2016).

### **2.1.4 Entwicklung von follikulären B-Zellen und Keimzentrumsreaktion**

Follikuläre B-Zellen zirkulieren nach dem Verlassen der Milz als IgD+CD27- naive Zellen (Naive) im Blut und wandern in lymphatische Gewebe ein, um dort weiter zu differenzieren (nach Capolunghi et al. 2013).

In sekundär lymphatischen Organen wie Lymphknoten und der Milz sammeln sich die naiven B-Zellen vorwiegend in primären Lymphfollikeln. Bindet der B-Zell Rezeptor einer B-Zelle im Lymphfollikel das für sie passende Antigen, führt dies zur Aktivierung der Zelle (nach De Silva und Klein 2015).

Diese Aktivierung löst eine starke Proliferation der B-Zelle aus, so dass aus ihren Nachfahren ein sog. Keimzentrum entsteht. Die Aktivierung bewirkt die weitere Differenzierung der Zelle zur Keimzentrums-B-Zelle, Gedächtniszelle oder Plasmazelle, wobei nicht jede Aktivierung auch eine vollständige Differenzierung nach sich zieht. Um die zur Differenzierung notwendigen T-Zell abhängigen Signale zu erhalten, wandert die B-Zelle an den Rand zwischen B- und T-Zell Zone des Follikels (interfollikuläre Region) (nach Taylor et al. 2015). In der interfollikulären Region wird die B-Zelle durch die antigen-spezifische T-Helferzelle stimuliert. Die T-Helferzelle bindet das von der B-Zelle auf MHC-II präsentierte Antigen über ihren T-Zell Rezeptor. Im Zuge dieser Interaktion stimuliert die T-Zelle die B-Zelle über unterschiedliche Signale: Der von der T-Zelle exprimierte CD40-Ligand bindet den

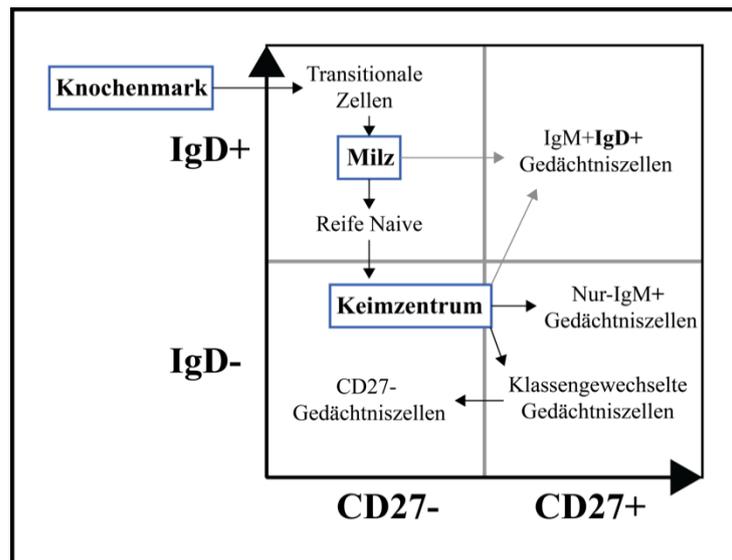
entsprechenden CD40-Rezeptor auf der B-Zell Oberfläche. Auch von der T-Zelle ausgeschüttete Zytokine wirken auf die B-Zelle ein. Diese Stimuli führen gemeinsam zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle. Die aktivierte B-Zelle wandert nun ins Zentrum des Follikels, wo sich folliculäre dendritische Zellen (FDCs) befinden. Durch massive Proliferation (klonale Expansion) werden die dort befindlichen folliculären B-Zellen verdrängt und das entstehende Keimzentrum wächst heran. Im Zuge der Keimzentrumsreaktion kommt es zur somatischen Hypermutation (SHM). Hierbei kommt es zu Punktmutationen in den variablen Regionen von schwerer und/oder leichter Antikörper Kette, was die Affinität und/oder Spezifität des Antikörpers verändert. Durch den Prozess der nun folgenden Affinitätsreifung wird das Wachstum und Überleben der Klone unterstützt, die das Zielantigen der jeweiligen Keimzentrumsreaktion besonders affin und spezifisch binden. Auf diese Weise wachsen in mehreren Proliferations- und Selektionsrunden nur die affinsten und spezifischsten B-Zellen heran (nach Murphy et al. 2016).

Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion kommt es in einem Teil der Zellen auch zum Antikörper-Klassenwechsel. Hierbei kommt es durch Rekombinationen in repetitiven DNA Sequenzen, die außerhalb der eigentlichen C-Region liegen, zu Veränderungen in der für die schwere Antikörper Kette codierenden Region. Dies führt zu einem Wechsel der produzierten Immunglobulin Klasse von IgM zu IgG, IgA oder IgE. Die unterschiedlichen Antikörper Klassen erfüllen unterschiedliche Funktionen (nach Kurosaki et al. 2015). So können lösliche IgG Antikörper zum Beispiel nach Bindung an einen Erreger das Komplementsystem aktivieren und so die Zerstörung der Zielzelle vermitteln. Antikörper der Klasse E (IgE) können u.a. die Aktivierung von Mastzellen vermitteln, die in der Abwehr parasitärer Erreger eine Rolle spielen (nach Murphy et al. 2016).

### **2.1.5 Aus Aktivierung resultierende Populationen**

Die Aktivierung von B-Zellen in lymphatischen Geweben führt allerdings nicht immer zu einer Keimzentrumsreaktion. Einige B-Zellen proliferieren nach Interaktion mit der passenden T-Zelle und bilden keimzentrumsunabhängig extrafollikuläre kurzlebige Plasmazellen, die Antikörper produzieren. Andere Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen (s.u.), ohne eine Keimzentrumsreaktion eingegangen zu sein. Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, differenzieren entweder zu Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen (nach Kurosaki et al. 2015).

## 2.1.6 Gedächtnis-B-Zellen



**Abbildung 1: Abbildung zur Veranschaulichung der Entwicklung von Subpopulationen von Gedächtnis-B-Zellen**

Gedächtniszellen entstehen aus unreifen Vorläuferzellen (Transitionale B-Zellen). Reife Naive B-Zellen exprimieren IgD und sind CD27-negativ. CD27+ Gedächtniszellen können in IgD+ (IgM Mem) und IgD- (Sw Mem) Zellen unterteilt werden. IgD-CD27- Zellen sind CD27- Gedächtniszellen (CD27- Mem).

Gedächtniszellen haben nach dem Antigenkontakt die Affinitätsreifung durchlaufen und verbleiben nun im Organismus. Diese Zellen können bei einem erneuten Antigenkontakt schnell reaktiviert werden, ohne dass eine erneute Keimzentrumsreaktion ablaufen muss. Somit dienen diese Zellen dem Aufbau einer Immunität gegenüber ihrem Antigen.

Gedächtniszellen zirkulieren u.a. im peripheren Blut. Diese Zellen exprimieren im Unterschied zu B-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten (naive Zellen) CD27 auf ihrer Oberfläche (nach Agematsu et al. 2000). Dies ermöglicht die Unterscheidung der beiden Populationen.

### 2.1.6.1 Subpopulationen von B-Gedächtniszellen

Neben CD27+ finden sich auch kleine Populationen CD27- IgD- Zellen im peripheren Blut. Diese Zellen haben Klassenwechsel vollführt, hatten also Antigenkontakt, tragen aber kein CD27 auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 1) (Wu et al. 2011).

Obwohl CD27 fehlt, ähneln diese Zellen CD27+ Gedächtniszellen und werden als CD27- Gedächtniszellen (CD27- Mem) bezeichnet. Es wird vermutet, dass es sich um erschöpfte,

ehemals CD27<sup>+</sup> Gedächtniszellen handeln könnte. Die Funktionen und Eigenschaften dieser Zellen sind aber noch nicht vollständig geklärt (nach Seifert und Küppers 2016).

Klassische klassengewechselte Gedächtniszellen (switched memory, Sw Mem) tragen an Stelle von IgD andere Immunglobulinklassen (IgA, IgE oder IgG) und exprimieren CD27. Diese Zellen sind IgD-CD27<sup>+</sup>. Allerdings existieren auch auch IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> Gedächtniszellen (Nur-IgM-Gedächtniszellen), die bei einer Färbung von IgD und CD27 ebenfalls ins Kompartiment der IgD-CD27<sup>+</sup> Zellen fallen (nach Kurosaki et al. 2015).

Diese Zellen machen nur etwa 5% der peripheren B-Zellen aus. Es ist allgemein akzeptiert, dass diese Nur-IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, dabei jedoch keinen Klassenwechsel vollzogen. Es handelt sich also um reife Gedächtniszellen (nach Seifert und Küppers 2016).

Neben klassengewechselten Gedächtniszellen sind auch Plasmablasten, Plasmazellen und Nur-IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen (s.u.) IgD<sup>-</sup> und CD27<sup>+</sup> (nach Kurosaki et al. 2015).

### **2.1.6.2 IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Memory Zellen**

Im peripheren Blut finden sich auch IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtniszellen. Diese Zellen tragen im Unterschied zu Nur-IgM-Gedächtniszellen neben IgM auch IgD auf ihrer Oberfläche und werden hier deshalb als IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen (IgM Mem) bezeichnet (Shi et al. 2003). Der Ursprung IgM/IgD doppelt positiver Gedächtniszellen ist umstritten: Es ist unklar, ob diese Zellen die T-Zell abhängige Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben oder nicht. Möglicherweise handelt es sich um eine heterogene Population. Patienten mit loss-of-function Mutationen des für den Klassenwechsel notwendigen CD40L entwickeln auch IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Gedächtniszellen, wenn auch nur in geringer Menge. Dies spricht dafür, dass zumindest ein Teil der IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Gedächtniszellen sich unabhängig von der Keimzentrumsreaktion entwickelt, weil diese T-Zell abhängige Signale wie CD40L benötigt (s.o.). Die starke Reduktion der IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Gedächtniszellen, und die Beobachtung dass diese Zellen und IgG<sup>+</sup> Gedächtniszellen ähnliche Funktionen haben und beide in die Keimzentrumsreaktion eintreten können, spricht wiederum für eine Keimzentrumsabhängigkeit. Des Weiteren weisen diese Zellen in ähnlichem Maße wie IgG<sup>+</sup> Gedächtniszellen Mutationen von BCL6 auf. Weil die activation-induced cytidine deaminase (AID) und ihr Ziel BCL6 nur in Keimzentrumszellen co-exprimiert werden, spricht dies ebenfalls für einen Keimzentrumsursprung (s. Abb. 1/graue

Pfeile) (Seifert und Küppers 2016). IgM Mem Zellen produzieren hochaffine Antikörper der Klasse IgM, die eine wichtige Rolle in der frühen Phase von Infektionen spielen (Shi et al. 2003). Weil Phänotyp und Gen-Profil von IgM Mem Zellen dem von MZ-B-Zellen stark ähneln, wird angenommen, dass es sich bei IgM Mem Zellen um das im Blutkreislauf zirkulierende Gegenstück zu den MZ-B-Zellen der Milz handelt (Weller et al. 2004).

### 2.1.6.3 Plasmablasten und Plasmazellen

Aktivierte B-Zellen können zu Gedächtnis- oder sog. Antikörperproduzierenden Zellen differenzieren. Diese Antikörperproduzierenden Zellen unterscheiden sich in Morphologie, Gen-Expressionsprofil und Lebenserwartung von ihren B-Zell Vorläufern. Antikörperproduzierende Zellen umfassen Plasmablasten und Plasmazellen. Plasmablasten sind kurzlebige, antikörperproduzierende und teilungsfähige Zellen. Diese Zellen haben ein hohes Migrationspotential und entstehen relativ früh nach dem Antigenkontakt. Dementsprechend dienen diese Zellen primär der frühen Etablierung einer humoralen (=Antikörper-vermittelten) Immunität (nach Nutt et al. 2015). Nach Infektionen können auch im peripheren Blut CD38/CD27 hochpositive Gedächtniszellen gefunden werden. Diese sogenannten stationären Plasmazellen (steady state plasma cells), werden gemeinhin als Plasmablasten bezeichnet (nach Caraux et al. 2010).

Plasmablasten können keimzentrumsabhängig und keimzentrumsunabhängig entstehen. Es wird vermutet, dass Plasmablasten entweder zu Plasmazellen ausdifferenzieren oder zugrunde gehen. Plasmazellen sind im Gegensatz zu Plasmablasten nicht mehr teilungsfähig. Sie produzieren und sezernieren Antikörper in großen Mengen. Plasmazellen wandern nach ihrer Entstehung ins Knochenmark ein. Dort verbleiben die Zellen dann in sog. Nischen, wo sie mit spezifischen Signalen zum Überleben stimuliert werden und somit der Erhaltung der humoralen Langzeitimmunität dienen (nach Nutt et al. 2015).

Im Zuge der Differenzierung aktivierter B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen regulieren die Zellen den Pan-B-Zell Marker CD20 herunter und beginnen CD138 zu exprimieren. Während Plasmablasten CD20 in in geringem Maße exprimieren, zeigen Plasmazellen keine CD20 Expression mehr. Sowohl Plasmablasten als

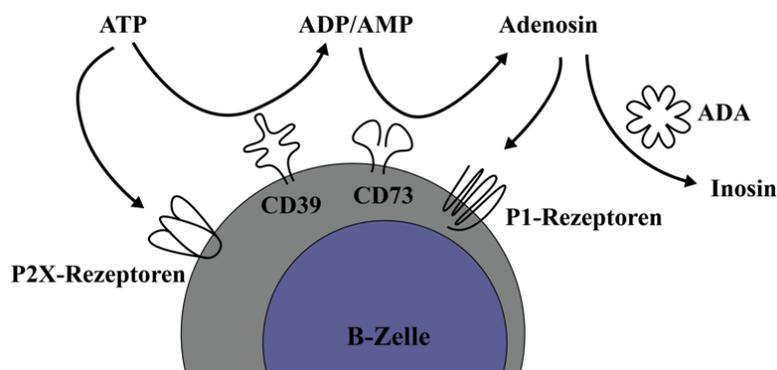
**CD19** (B-Lymphozyten Antigen) dient als Pan-B-Zell Marker und bildet einen Komplex mit **CD21** (Komplement-Rezeptor 2) und CD81, der als Co-Rezeptor für den B-Zell Rezeptor fungiert (nach Murphy et al. 2016).

auch Plasmazellen exprimieren weiterhin CD19 (nach Jego et al. 2001).

### 2.1.7 CD21<sup>low</sup> Zellen

Neben den beschriebenen Populationen finden sich im peripheren Blut auch Zellen, die keiner Differenzierungsstufe klar zugeordnet werden können. Ein Teil der B-Zellen des peripheren Blutes exprimiert kein CD38 und CD21 in nur sehr geringem Maße. Diese B-Zellen werden als CD21<sup>low</sup> B-Zellen bezeichnet. CD21 bildet gemeinsam mit CD19 und CD81 einen Komplex, der als Co-Rezeptor für den B-Zell Rezeptor fungiert. CD21 kann Fragmente des Komplementsystems binden. Außerdem kann an der Zelloberfläche vorkommendes CD21 proteolytisch abgeschnitten und abgeworfen werden. Die Expression von CD21 wird nach der Aktivierung von B-Zellen herunterreguliert. CD21<sup>low</sup> Zellen tragen kein CD38, dafür aber andere Aktivierungsmarker wie CD69, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig tragen diese Zellen auch inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. CD21<sup>low</sup> Zellen haben zum Großteil eine somatische Hypermutation durchlaufen und werden deshalb zu den reifen Gedächtniszellen gezählt. Allerdings exprimiert nur ein Teil der Zellen den Gedächtniszell-Marker CD27. Bei *in-vitro* Stimulation über den B-Zell Rezeptor können die Zellen nur in geringem Maße zur Proliferation aktiviert werden. Trotzdem führte die Stimulation mit T-Zell abhängigen Signalen *in vitro* zur Differenzierung zu Plasmazellen (nach Thorarinsdottir et al. 2015).

## 2.2 Extrazelluläres ATP als Gefahrensignal



**Abbildung 2: Übersicht über die extrazelluläre ATP- Signalkaskade**  
Extrazelluläres ATP kann über P2-Rezeptoren aktivierend auf Immunzellen wirken oder mit Hilfe der Ektoenzyme CD39 und CD73 zu Adenosin hydrolysiert werden. Adenosin kann über P1-Rezeptoren inhibierend auf Immunzellen wirken.

Wenn Zellen Stress ausgesetzt, nekrotisch werden oder in Apoptose gehen, wird das aus dem Energiestoffwechsel bekannte Adenosin-Triphosphat (ATP) über Pannexin-1 Kanäle in der

Zellmembran aus dem Intrazellulärraum freigesetzt. Lymphozyten tragen Rezeptoren, die in der Lage sind dieses archaische Gefahrensignal zu detektieren: Die sog. P2-Rezeptoren. P2-Rezeptoren binden extrazelluläres ATP und tragen zur Aktivierung der entsprechenden Immunzelle bei (Cekic und Linden 2016). Extrazelluläres ATP kann alternativ über extrazelluläre, membrangebundene Enzyme hydrolysiert werden: Die NTPDase-1 (CD39) hydrolysiert extrazelluläres ATP und ADP. Das dabei entstehende AMP kann vom Ektoenzym 5'-Nukleotidase (CD73) weiter zu Adenosin hydrolysiert werden. Während T-Zellen i.A. entweder CD39 oder CD73 exprimieren, co-exprimieren etwa 50% der B-Zellen beide Enzyme auf ihrer Oberfläche. Somit sind B-Zellen in der Lage extrazelluläres ATP in Adenosin umzuwandeln, welches dann über die sog. P1-Rezeptoren seine Wirkung vermitteln kann (nach Cekic und Linden 2016; Schena et al. 2013). Bei den P1-Rezeptoren handelt es sich um vier G-Protein gekoppelte Rezeptoren (A1-R, A2A-R, A2B-R und A3-R). Im Zuge der Aktivierung von Immunzellen werden die Rezeptoren A2A und A2B hochreguliert, die bei Bindung von extrazellulärem Adenosin die intrazelluläre Protein-Kinase-A (PKA) aktivieren. Als Folge dieser Signalkaskade kommt es zu einer Hemmung der Aktivierung der entsprechenden Zelle. Zur Beendigung des Signals kann extrazelluläres Adenosin entweder in den Intrazellulärraum geschleust oder über die Adenosin-Deaminase (ADA) extrazellulär zu Inosin abgebaut werden (s. Abb. 2). Zusammenfassend stimuliert freigesetztes ATP als Gefahrensignal Immunzellen, während das aus der Hydrolyse von ATP hervorgehende Adenosin supprimierend auf Immunzellen einwirkt (nach Cekic und Linden 2016).

Neben den Ektoenzymen CD39 und CD73 exprimieren B-Zellen auch P1- und P2-Rezeptoren. Somit kann extrazelluläres ATP B-Zellen stimulieren, nach der extrazellulären Hydrolyse aber auch supprimierend wirken. Inzwischen konnte ein auf dieser Achse basierender autokriner Stimulationsmechanismus in B-Zellen identifiziert werden: Humane naive und IgM-Mem B-Zellen setzen *in vitro* nach Stimulation des B-Zell Rezeptors bei gleichzeitiger Stimulation von Toll-like-Rezeptoren ATP frei. Das intrazellulär in Calcium-sensitiven Vesikeln gespeicherte Nukleotid wird durch Exozytose in den Extrazellulärraum entlassen, wo es von CD39 und CD73 zu Adenosin umgesetzt werden kann. Diese Achse vermittelte *in vitro* bei gleichzeitiger Stimulation von B-Zellen mit löslichen Stimuli den Klassenwechsel. B-Zellen von Patienten mit chronisch-variabler Immundefizienz (CVID) zeigten eine signifikant verminderte Expression von CD73 im Vergleich zu B-Zellen von gesunden Spendern. Des Weiteren konnten die B-Zellen dieser Patienten *in vitro* signifikant schlechter zum Klassenwechsel stimuliert werden als B-Zellen von gesunden Spendern. Auch isolierte CD73-negative B-Zellen konnten *in vitro* nur in deutlich geringerem Maße zum

Klassenwechsel stimuliert werden als CD73<sup>+</sup> B-Zellen (Skena et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von B-Zellen mit P1-Rezeptor-Agonisten die Proliferation der Zellen supprimiert, was durch eine Blockade des A3R auf B-Zellen zum Teil rückgängig gemacht werden konnte (Saze et al. 2013).

Infektionen mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) wirken sich auf die Zusammensetzung des peripheren B-Zell Pools aus (nach Moir und Fauci 2013). Weil die oben beschriebene CD39-CD73-Adenosin-Achse zusätzlich eine Rolle in der durch CD39<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen vermittelten Hemmung von T-Zellen und dem Fortschreiten der AIDS Erkrankung spielt (Nikolova et al. 2011), wurden in dieser Arbeit auch periphere Blutproben von behandelten und unbehandelten HIV Patienten analysiert. Extrazelluläres Adenosin spielt also wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Funktionalität von B-Zellen in Gesundheit und Krankheit.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Probenbeschaffung**

40 EDTA Blutproben peripheren Blutes wurden anonymisiert aus der Blutbank des Universitätsklinikums Eppendorf entnommen und als gesunde Kontrollkohorte untersucht. Des Weiteren wurden EDTA Patienten-Blutproben, die in das Immundiagnostik Labor des Universitätsklinikums Eppendorf zur Phänotypisierung eingesandt wurden, pseudonymisiert untersucht. Darunter waren 242 Proben, die zur Charakterisierung der B-Zell-Differenzierung, und 50 Proben von HIV-Patienten, die zur Erhebung des Lymphozytenstatus eingesandt worden waren. Zur Erarbeitung des Panels wurde auf EDTA Blutproben von gesunden Spendern aus dem Institut für Immunologie zurückgegriffen, die eine Einverständniserklärung nach erfolgter Aufklärung unterschrieben haben.

#### **3.2 Immunphänotypische Analyse und intrazelluläre Färbung**

Mindestens 100µl EDTA Vollblut wurden in ein 5ml BD Falcon Tube (BD, Heidelberg, Germany) gegeben. Nachdem die Proben zwei mal mit 3ml DPBS (Life Technologies, Carlsbad, USA) + 0,1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen und abzentrifugiert wurden, folgte die Inkubation mit maximal 8 ausgewählten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen extrazelluläre Antigene (siehe Tabelle 1 unten) in zuvor titrierten Konzentrationen und 50µl BD Horizon Staining Buffer (BD, Heidelberg, Germany). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C im dunklen wurde ein zweites mal mit 1ml BD Lysing Solution (BD, Heidelberg, Germany) zur Lyse von Erythrozyten und Fixation für 15 Minuten im dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit 3ml DPBS/0,1% BSA. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die Zellen abdekantiert und auf Eis im Dunkeln bis zur Messung gelagert. Diese Zeit betrug maximal 2 Stunden. In einigen Fällen wurden mehr als 100µl EDTA Vollblut nach dem beschriebenen Protokoll verarbeitet, um bei der späteren Messung größere Zellzahlen erreichen zu können.

Für die Färbung des intrazellulären Antigens bcl-2 wurde die Zellsuspension nach dem letzten Waschschrift für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 1ml BD Fixation/Permeabilization Solution (BD, Heidelberg, Germany) inkubiert. Die nun permeabilisierten und fixierten Zellen wurden nach einem Waschschrift mit einem Antikörper

gegen bcl-2 für 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben abdekantiert und auf Eis im Dunklen bis zur Messung gelagert.

Die Messung erfolgte mit einem BD FACS Canto II (BD, Heidelberg, Germany). BD FACSDIVA™ (Version 8.0.1) (BD, Heidelberg, Germany) wurde zur Einstellung von Parametern und zur Überwachung der Messung genutzt. Die erzeugten Daten wurden als Dateien im Format .fcs exportiert.

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper für FACS Färbungen**

<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Hersteller</b>
HI30	Maus	CD45	APC.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)
HIB-19	Maus	CD19	APC.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)
IA6-2	Maus	IgD	BV510	Biologend (San Diego, CA, USA)
M-T271	Maus	CD27	BV421	Biologend (San Diego, CA, USA)
ML5	Maus	CD24	PerCp.Cy5.5	Biologend (San Diego, CA, USA)
HIT2	Maus	CD38	FITC	Biologend (San Diego, CA, USA)
Bu32	Maus	CD21	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
Bu32	Maus	CD21	PE.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)
AD2	Maus	CD73	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
AD2	Maus	CD73	APC	Biologend (San Diego, CA, USA)
HIB-19	Maus	CD19	PE.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)
HI10a	Maus	CD10	APC	Biologend (San Diego, CA, USA)
MHM-88	Maus	IgM	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
L17F12	Maus	CD5	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
A1	Maus	CD39	PE.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)
L243	Maus	HLA-DR	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
UIC2	Maus	CD243	APC	eBioscience (San Diego, CA, USA)
100	Maus	Bcl-2	PE	Biologend (San Diego, CA, USA)
HIB19	Maus	CD19	APC.Cy7	Biologend (San Diego, CA, USA)

### **3.3 Grundprinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Bestrahlung einzelner Partikel (meist Zellen) mit monochromatischen Lasern definierter Wellenlängen. Diese Bestrahlung resultiert in einer Streuung des monochromatischen Lichts, was eine Aussage über Größe und Granularität der Zellen erlaubt. Hat eine Zelle einen oder mehrere fluoreszierende Farbstoffe gebunden, können diese durch den entsprechenden monochromatischen Laser angeregt und zur Emission

von Licht einer anderen Wellenlänge bewegt werden. Durch Spiegelung und Filterung des emittierten Lichts, kann dieses auf Detektoren umgeleitet und erfasst werden. Zur Vorbereitung der Messung wird eine intra- oder extrazelluläre Färbung (siehe oben) durchgeführt. Hierbei binden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper ihre Antigene auf den Zellen. Die Zellsuspension wird im Durchflusszytometer mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit und Druckluft angesaugt und in einem laminaren Strom inmitten der Trägerflüssigkeit zu einem Einzelzellstrom verdünnt. Auf diese Weise kann jede Zelle einzeln von einem oder mehreren Lasern bestrahlt und analysiert werden. Auch unmarkierte Zellen streuen das Licht des Lasers. Hierbei kommt es sowohl zu einer Streuung des Lichts in Strahlungsrichtung (Forwardscatter, FSC), als auch zu einer Streuung des Lichts in einem Winkel von 90° (Sidescatter, SSC). Die FSC lässt eine Aussage über die Größe der Zellen zu, während die SSC als Maß für die Granularität der Zellen dient. Wird ein an Antikörper gekoppeltes Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) von einem monochromatischen Laser der passenden Wellenlänge angeregt, emittiert der Farbstoff Licht eines charakteristischen Wellenlängenspektrums. Dieses emittierte Licht wird durch Filter und Spiegel umgeleitet und trifft schließlich auf einen Detektor. Die Detektoren sind in der Lage Licht bestimmter Wellenlängen zu erfassen und dessen Intensität zu quantifizieren (sog. Fluoreszenzintensität, einheitslos). Die Intensität des emittierten Lichts erlaubt eine Aussage über die Höhe der Expression des Zielantigens. Da die Fluoreszenzintensität u.a. von der Menge des zugegebenen Antikörpers und der Energie der Laser abhängt und beides zwischen unterschiedlichen Messungen variieren kann, ist die Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Experimente nur bedingt vergleichbar. Zu Beginn wird die Analyse auf Zellen eingegrenzt (gated), deren Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellpopulation von Interesse entsprechen. Danach wird die Forwardscatter-height (FSC-H) gegen die Forwardscatter-area (FSC-A) aufgetragen. In diesem Diagramm sind einzelne Zellen nahe der Winkelhalbierenden zu finden. Durch Gating auf diese Populationen, werden Zelldoubletten von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Anschließend werden die angefärbten Antigene analysiert (Luttmann et al. 2014).

Diese konventionelle Auswertung der FACS Daten wurde vollständig abgeschlossen, bevor die Ergebnisse der tSNE/SPADE Analysen vorlagen. Dies erlaubte einen Vergleich der Ergebnisse der beiden Analysen.

### 3.4 Statistische Analyse

Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit FlowJo Version X, Firma FlowJo LLC (Ashland, Oregon, USA) ausgewertet und in Tabellen exportiert. Die darauf folgende statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 5, Firma GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA) durchgeführt. D'Agostino und Pearson omnibus Normalitätstests wurden vor der weiteren Analyse ausgeführt, um zu ermitteln, ob die Datensätze normalverteilt sind. Normalverteilte Daten wurden mit dem einfachen ANOVA und dem Tukey Post Test auf signifikante Unterschiede getestet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem einfachen ANOVA und Kruskal-Wallis und Dunns Post Test getestet.

Alle Graphen sind als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes gezeigt.

P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als signifikant angesehen.

### 3.5 T-SNE

Für die Analyse mit tSNE wurden alle FACS Dateien von Spendern auf die gleiche Anzahl an Zellen reduziert. Da die kleinste FACS Datei diese Zellzahl bestimmte, wurden FACS Dateien mit geringen Zellzahlen (<8400 B-Zellen) aus der Analyse ausgeschlossen. Deshalb gingen nur insgesamt 19 von 20 erhobenen HD\_IgM Dateien und 15 von 20 erhobenen ART\_IgM Dateien in die Analyse ein. Die mit tSNE und SPADE untersuchten Kohorten entsprachen nicht den mit dem konventionellen Gating untersuchten Kohorten (gleiche Einschlusskriterien, aber Blutproben von anderen Individuen). Des Weiteren wurde bei der FACS Färbung für die hier untersuchten Daten im Unterschied zum B-Zell Panel (s.o.) der Marker CD45 durch den Marker IgM ersetzt. Diese Daten wurden mit Hilfe des Dimensionsreduktionsalgorithmus t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) maschinell und damit objektiv untersucht. Diese Methode erlaubt die Darstellung hochdimensionaler Daten im zwei- oder dreidimensionalen Raum. Während der FACS-Analyse wird für jede einzelne Zelle die Fluoreszenzintensität für jede zu messende Fluoreszenzfarbe detektiert. Nach Färbung und Analyse von Proben, deren n Zellen mit acht Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert wurden, liegt also eine Matrix mit n Zeilen und acht Spalten vor. Jede Zelle kann also in einem theoretischen acht-dimensionalen Raum aufgetragen werden. T-SNE reduziert diese Dimensionen, indem jeder Zelle eine Position im resultierenden zwei- oder dreidimensionalen Raum zugeordnet wird. Die Position im Raum

wird so berechnet, dass sich in allen Dimensionen ähnelnde Zellen in Nachbarschaft angeordnet werden. Die daraus resultierende Abbildung kann nun nach Dichte (Anzahl der Zellen pro Fläche/Raum) oder nach Fluoreszenzintensität eines bestimmten Kanals farbkodiert dargestellt werden. Für eine detailliertere Beschreibung der Methode siehe (Van Der Maaten und Hinton 2008; Van der Maaten 2014).

Für die Analyse wurden die Programmiersprache R (R Development Core Team 2008) und das Paket *Rtsne* (Krijthe 2015) verwendet. Um die t-SNE-Graphen aller Donoren besser vergleichen zu können, wurden die FCS-Dateien der einzelnen Spender zunächst pro Gruppe zusammengefügt und beide Gruppen wurden per Zufallsauswahl auf eine gleiche Anzahl an Zellen (125.970) reduziert. Anschließend wurden die reduzierten Daten beider Gruppen zusammengefügt und die Funktion *Rtsne* wurde, parametrisiert mit Perplexität = 100 und Anzahl der Iterationen = 4000, ausgeführt. Nach Beendigung der Analyse wurden die Gruppen wieder separiert und sowohl nach Fluoreszenzintensität farbcodierte als auch Dichte-Graphen beider Gruppen wurden erstellt.

### 3.6 SPADE

Bei spanning-tree progression analysis of density-normalized events, kurz SPADE, handelt es sich um eine Methode zur Analyse hochdimensionaler Datensätze, die darauf ausgelegt ist selbstständig eine Hierarchie innerhalb des eingepflegten Datensatzes zu finden und darzustellen. SPADE betrachtet die Daten als hochdimensionale Punktwolke und nutzt topologische Methoden um die Geometrie der Wolke aufzudecken. Die Analyse setzt sich hierbei aus vier aufeinanderfolgenden Schritten zusammen. Zuerst wird die Datenwolke dichteabhängig verkleinert, damit häufige und seltene Zellpopulationen gleichmäßig repräsentiert werden. Dieser Schritt erlaubt SPADE auch kleine Zellpopulationen zu entdecken. Danach nutzt SPADE agglomeratives Clustering, um Zellgruppen (cluster) zu identifizieren, die sich in ihrem Phänotyp ähneln. Als nächstes wird aus diesen Zellclustern ein minimaler Spannbaum erzeugt. Dieser verbindet alle Cluster mit minimaler Gesamtkantenlänge, sodass ähnliche Cluster über wenige Kanten verbunden beieinander liegen. Im letzten Schritt wird jede Zelle der nicht reduzierten Daten demjenigen Cluster zugeordnet, dessen Phänotyp sie am meisten ähnelt. Auf diese Weise ordnet SPADE die Datenpunkte (Zellen) objektiv nach Ähnlichkeit des Phänotyps in Cluster und setzt diese Cluster hierarchisch in Beziehung zueinander. Für Details des Algorithmus siehe (Qiu et al. 2011).

Für die vorliegende Arbeit wurde zunächst mittels des R-Pakets *spade* (Linderman et al. 2018) und dem Parameter Clusteranzahl = 30 der SPADE-Baum aus denselben per Zufallsauswahl reduzierten Daten, die auch für die t-SNE-Analyse verwendet wurden, erstellt. Die weiterführende Analyse wurde mit Hilfe verschiedener, leicht angepasster Funktionen, des R-Paketes *SPADEVizR* (Gautreau et al. 2017) durchgeführt, welches neben einer anschaulichen graphischen Darstellung der Ergebnisse, auch vergleichende Analysen zwischen den eingepflegten Kohorten erlaubt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Architektur und Anwendung des erarbeiteten B-Zell Panels

Lasertyp	Violetter Laser (405nm)		Blauer Laser (488nm)				Roter Laser (640nm)	
Fluorochrom	BD Horizon Brilliant™ Violet 421	BD Horizon Brilliant™ Violet 510	FITC	PE	PerCP-Cy™5.5	PE-Cy™7	APC	APC-Cy™7
Antigen	CD27	IgD	CD38	CD21	CD24	CD19	CD73	CD45

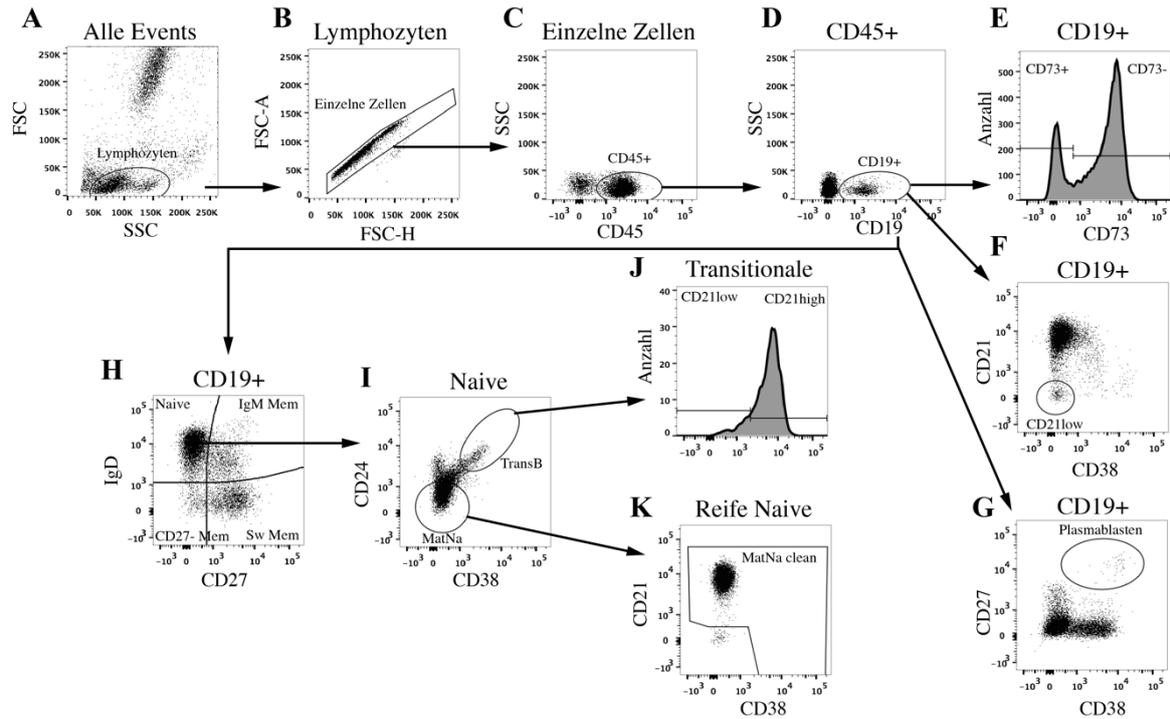
*Abbildung 3: Aufbau des erarbeiteten FACS Panels zur Analyse von B-Zell Subpopulationen*

Das Färbepanel setzt sich aus acht Antikörpern zusammen, die an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind. Die Antikörper binden die Antigene CD27, IgD, CD38, CD21, CD24, CD19, CD73 und CD45.

Zur Erarbeitung des FACS Panels zur Analyse von B-Zell Subpopulationen wurden EDTA Blutproben von gesunden Spendern aus dem Institut für Immunologie verwendet. Die Probefärbungen werden hier nicht gezeigt. Der Begriff Panel meint die Kombination der für jede Färbung verwendeten Antikörper. Das finale Panel (s. Abb. 3) setzte sich aus insgesamt acht Antikörpern zusammen, die je ein Antigen binden und an acht unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt waren.

Das Panel umfasste neben Antikörpern gegen sieben Antigene, die zur Differenzierung von relevanten B-Zell Subpopulationen dienen, auch das Antigen 5'-Nukleotidase (CD73). CD73 wird bisher nicht routinemäßig zur Identifizierung klinisch relevanter B-Zell Subpopulationen genutzt. Es wurde in unser Panel eingeschlossen, weil es alte Beobachtungen gab, dass die Expression von CD73 auf B-Zellen von Patienten mit COVID vermindert ist (Johnson et al. 1977; Edwards et al. 1978), und in einer kürzlich erschienen Arbeit die Enzymaktivität von CD73 mechanistisch mit dem Immunglobulin Klassenwechsel in Verbindung gebracht worden war (Schna et al. 2013).

Eine FACS Analyse mit den oben gezeigten Antikörpern erlaubte neben der Identifikation von B-Zellen in Proben peripheren Blutes, auch die weitere Unterteilung dieser. Die Aufteilung der Populationen wird in Abbildung 4 dargestellt.



#### Abbildung 4: Unterteilung der unterschiedlichen Subpopulationen von B-Zellen

Veranschaulichung der angewendeten Gating Strategie anhand einer FACS Analyse der Probe eines gesunden Spenders. (A) Alle im FACS erfassten Ereignisse (Zellen) wurden nach Größe und Granularität aufgetragen, was eine Identifikation (= Gating) von Lymphozyten erlaubte. (B) Einzelne Zellen wurden auf der Winkelhalbierenden zwischen FSC-Fläche (FSC-A) und FSC-Höhe (FSC-H) erfasst. (C)  $CD45^+$  Lymphozyten wurden erfasst. (D) Aus den Lymphozyten wurden  $CD19^+$  B-Zellen ausgewählt. (E) Bei der Darstellung der CD73 Expression als Histogramm zeigte sich, dass B-Zellen in  $CD73^+$  und  $CD73^-$  Zellen unterteilt werden konnten. (F) Wurden B-Zellen für CD21 und CD38 aufgetragen, zeigte sich eine CD21-niedrig-exprimierende CD38- Population, sog.  $CD21^{low}$  Zellen. (G) Plasmablasten waren hochpositiv für die Marker CD27 und CD38. (H) B-Zellen ließen sich mit der Markerkombination CD27 und IgD in vier Subpopulationen unterteilen:  $IgD^+CD27^+$  (Naive),  $IgD^+CD27^+$  (IgM Mem),  $IgD^-CD27^+$  (Sw Mem) und  $IgD^-CD27^-$  (CD27- Mem). (I) Naive Zellen konnten mittels CD24 und CD38 u.a. in transitionale B-Zellen (TransB) ( $CD24^+CD38^+$ ) und reife Naive (MatNa) ( $CD24^{low}CD38^{low}$ ) unterteilt wurden. (J) TransB konnten weiter in CD21 niedrige (T1) und CD21 hohe (T2) Zellen aufgeteilt wurden. (K) Um ausschließlich reife Naive (MatNa) Zellen zu erfassen, wurden  $CD21^{low}$  Zellen ausgeschlossen. Übrig blieben bereinigte MatNa Zellen (MatNa clean).

Die gemessenen Zellen wurden mit Hilfe der FSC und SSC auf einzeln gemessene Zellen reduziert, die in Größe und Granularität Lymphozyten entsprechen. Nachdem mit Hilfe des Markers CD45 die Lymphozyten rein dargestellt wurden, konnten die B-Zellen anhand ihrer Expression von CD19 identifiziert werden (s. Abb. 4/A-D). Bei Betrachtung der unterschiedlichen angefärbten Marker wurde klar, dass die B-Zellen des Blutes in weitere Subpopulationen unterteilt werden konnten.

Trägt man alle CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen für IgD gegen CD27 auf, zeigten sich vier Subpopulationen, die unterschiedlichen reife und Differenzierungsgraden von B-Zellen entsprechen (s. Abb. 4/H; vgl. Abb. 1). CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> Zellen wurden als Naive Zellen bezeichnet. Naive Zellen konnten in weitere Subpopulationen unterteilt werden (s.u.). IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen wurden als IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen (IgM Mem) bezeichnet. Dass diese Zellen, wie in der Literatur beschrieben, neben IgD auch IgM exprimieren, konnte in Probefärbungen mit IgM bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Bei IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen handelte es sich größtenteils um klassengewechselte B-Zellen (Sw Mem). Dieses Kompartiment enthielt neben Plasmablasten und Plasmazellen auch einige wenige IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> sog. nur-IgM Gedächtniszellen (Daten nicht gezeigt). Bei IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> Gedächtniszellen (CD27<sup>-</sup> Mem) handelte es sich um reife Gedächtniszellen, die den Marker CD27 nicht exprimierten. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um erschöpfte, ehemals CD27<sup>+</sup> Gedächtniszellen handelt.

Trägt man naive B-Zellen eines gesunden Spenders für CD24 gegen CD38 auf, zeigte sich, dass naive Zellen neben CD24<sup>niedrig</sup>CD38<sup>niedrig</sup> exprimierenden reifen naiven Zellen (MatNa) auch unreife transitionale (TransB) Zellen umfassen (Abb. 4/I) (Capolunghi et al. 2008). TransB waren CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und konnten anhand ihrer CD21 Expression weiter in T1 (CD21<sup>niedrig</sup>) und T2 (CD21<sup>hoch</sup>) Zellen unterteilt werden, die aufeinanderfolgende Reifegrade widerspiegelten (Abb. 4/J) (Sims et al. 2005). Reife Naive (MatNa) Zellen enthielten einige CD21<sup>low</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen (s.u.). Nach Ausschluss dieser Population blieben ausschließlich CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD24<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup>CD21<sup>+</sup> bereinigte reife Naive Zellen (MatNa clean) übrig (Abb. 4/K). Diese stark eingegrenzte Population diente uns zum Vergleich der CD73 Expression auf reifen Naiven Zellen zwischen unterschiedlichen Kohorten (s.u.).

B-Zellen, die CD21 niedrig und kein CD38 exprimierten, wurden als CD21<sup>low</sup> Zellen bezeichnet (Abb. 4/F). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um reife Gedächtniszellen, über deren Funktion und Zusammensetzung noch Uneinigkeit herrscht (vgl. Abschnitt 2.1.7) (nach Thorarinsdottir et al. 2015).

Plasmablasten konnten innerhalb der CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen identifiziert werden, wenn diese für CD27 und CD38 aufgetragen wurden: Plasmablasten sind als Gedächtniszellen CD27<sup>+++</sup> und tragen CD38 in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche (Abb. 4/G) (nach Nutt et al. 2015).

Insgesamt ermöglichte das erarbeitete Panel also die Identifikation unterschiedlichster B-Zell Subpopulationen aus peripheren Blutproben.

**Table 2: Übersicht über die erfassten Kohorten**

<b>Kohorte (Kürzel)</b>	<b>Gemessene Parameter</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Anteil Frauen</b>	<b>Anteil Männer</b>	<b>Alter (Durschnitt mit Min. und Max.) in Jahren</b>
Gesunde Spender (HD) Mit IgM gemessene gesunde Spender (HD_IgM)	B-Zell Panel (n=20) und abgewandeltes B-Zell Panel (IgM statt CD45) (n=19)	39	40%	60%	36,35 (19-65)
Antiretroviral therapierte HIV positive Patienten (ART) Mit IgM gemessene gesunde Spender (ART_IgM)	B-Zell Panel (n=20) und abgewandeltes B-Zell Panel (IgM statt CD45) (n=15)	35	22,2%	77,8%	55,0 (21 – 79)
Nicht-antiretroviral therapierte HIV positive Patienten (viremic)	B-Zell Panel	10	23,1	76,9	42,2 (24 - 69)
Patientenkohorte aus Lymphozytenphänotypisierungen (Pat)	B-Zell Panel	242	49,8%	59,2%	24,14 (0,01-81,19)
Patienten mit chronisch-variabler Immundefizienz (CVID)	B-Zell Panel	50	36%	64%	21,12 (0,66-67)

Insgesamt konnten 292 Proben von Spendern nach dem oben beschriebenen Protokoll verarbeitet und analysiert werden. Folgende Kohorten haben sich ergeben: Gesunde Spender (kurz: HD, n=20), Antiretroviral therapierte HIV positive Patienten (kurz: ART, n=20), Nicht-antiretroviral therapierte HIV positive Patienten (kurz: viremic, n=10) und eine inhomogene Patientenkohorte aus Proben, die zur Lymphozytenphänotypisierung eingesandt wurden (kurz: Pat; n=242). Fälle innerhalb der Pat-Kohorte, die CVID diagnostiziert haben, wurden als CVID bezeichnet (n=50).

Die erfassten Spender-Kohorten sind in Tabelle 1 dargestellt. Neben 242 Patientenproben, die zur B-Zell-Phänotypisierung eingesandt wurden, konnten auch Proben von insgesamt 45 HIV infizierten Patienten und von 39 gesunden Spendern untersucht und in die finale Auswertung aufgenommen werden. Es ist anzumerken, dass das erarbeitete Panel bei einer Messung leicht abgewandelt wurde: Für die Messung von 19 gesunden Spendern (HD\_IgM) und 15 ART Patienten (ART\_IgM) wurde der anti-CD45 Antikörper durch einen Antikörper gegen IgM ersetzt. Sowohl HD\_IgM, als auch die ART\_IgM Kohorte wurden zum Zwecke der

Vergleichbarkeit nur für die bioinformatische Analyse mit tSNE und SPADE verwendet und aus der subjektiven konventionellen Analyse ausgeschlossen. Einige Patientenproben und Proben von HIV infizierten Patienten ohne Therapie wurden nicht in die Analyse aufgenommen, weil zu wenige B-Zellen für eine valide Auswertung in den FACS Dateien enthalten waren (unter 1000 Zellen). Die in Tabelle 1 gezeigten Kohorten umfassten nur Patienten, die auch tatsächlich in die finale Analyse aufgenommen wurden. Mangels Verfügbarkeit von passenden Daten zum Zeitpunkt der Blutentnahme, musste auf eine Auswertung der Viruslast und CD4-Zellzahl der HIV-Patienten verzichtet werden.

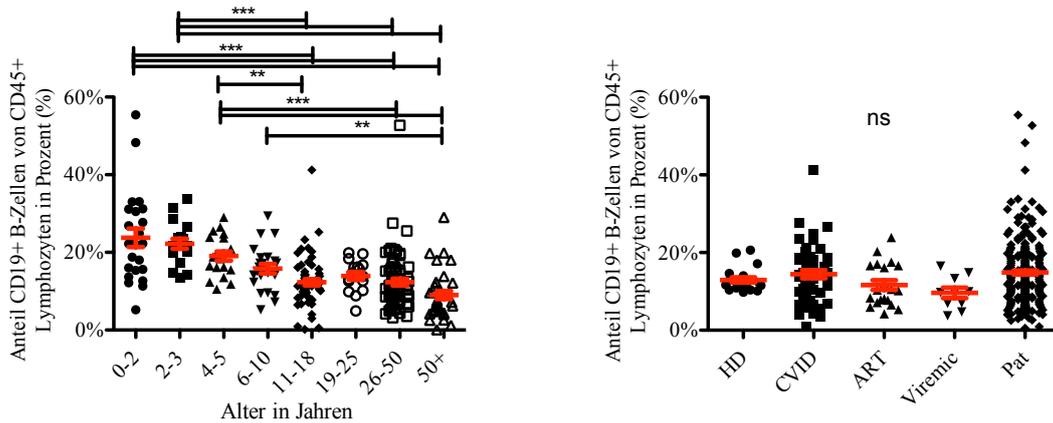
Der Anteil an Frauen bzw. Männern variierte zwischen den Kohorten, weshalb eine Analyse von Geschlechtereinflüssen auf die Verteilung der unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen innerhalb der Patientenkohorte durchgeführt wurde (s. Abb. 25). Es ergaben sich keine signifikanten Einflüsse des Geschlechtes auf die Anteile unterschiedlicher B-Zell Subpopulationen, weshalb das Geschlecht in den folgenden Auswertungen nicht näher betrachtet wurde.

#### **4.2 Der Anteil von CD19<sup>+</sup> B-Zellen an Lymphozyten im peripheren Blut fällt mit zunehmendem Alter ab**

Auf Grund der hohen Stichprobengröße der Patientenkohorte aus Lymphozytenphänotypisierungs-Anfragen wurde diese Kohorte gemäß Literatur (Morbach et al. 2010) für Analysen zum Einfluss des Lebensalters in unterschiedliche Altersgruppen unterteilt (s. Abb. 5). Vergleicht man nun den Anteil der CD19<sup>+</sup> B-Zellen an den CD45<sup>+</sup> Lymphozyten, so fällt auf, dass der Anteil CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Säuglingsalter mit durchschnittlich 23,76% signifikant höher lag als bei Patienten im Alter von 50 oder mehr Lebensjahren (Durchschnitt: 9,02%) (s. Abb. 5/A). Insgesamt fiel der Anteil der B-Zellen bis zum Jugendalter kontinuierlich ab. Ab dem Jugendalter stellte sich ein Plateau ein: Im Alter von über 11 Jahren lag der Anteil an B-Zellen relativ stabil bei im Mittel 12,3 bis 9,02% (s. Abb. 5/A).

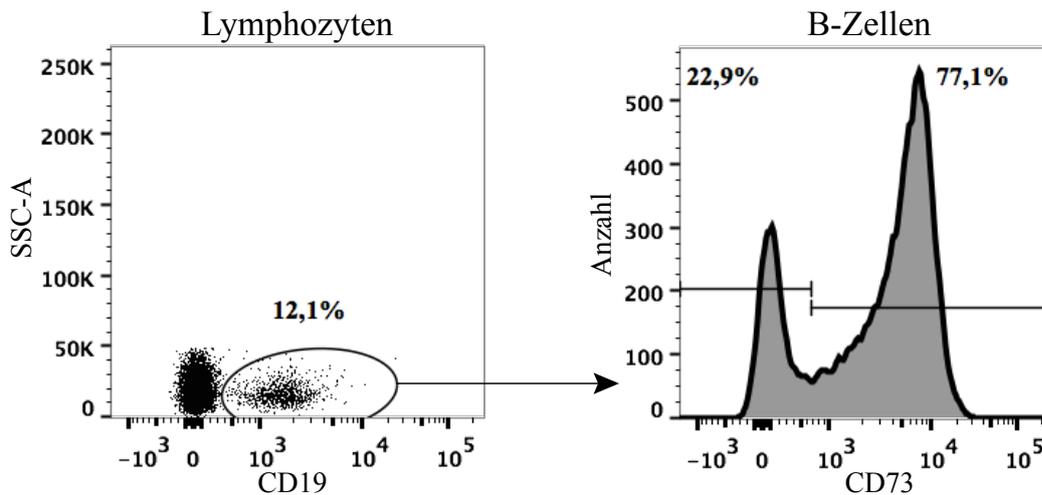
Bei gesunden Spendern lag der Anteil an B-Zellen bei im Durchschnitt 12,9%. Vergleicht man nun den Anteil an B-Zellen der unterschiedlichen Patientenkohorten mit dem von gesunden Spendern, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 5/B).

**A** Anteil B-Zellen von Lymphozyten nach Altersgruppe **B** Anteil B-Zellen von Lymphozyten nach Kohorten



**Abbildung 5: Der Anteil der CD19+ B-Zellen an den Lymphozyten im peripheren Blut fällt mit zunehmendem Alter ab**  
 Analyse des Anteils der CD19+ B-Zellen an den CD45+ Lymphozyten in peripheren Blutproben in unterschiedlichen Altersgruppen der Patientenkohorte aus B-Zell-Phänotypisierungs-Anfragen (Pat, n=242) und Vergleich der Patientenkohorten chronisch-variable Immundefizienz (CVID, n=50), antiretroviral therapierte HIV Patienten (ART, n=20), virämische HIV Patienten ohne Therapie (Viremic, n=10) mit einer Kohorte gesunder Blutspender (HD, n=20). (A) Analyse nach Altersgruppen innerhalb der ‚Pat‘ Kohorte. (B) Vergleichende Analyse des Anteils von B-Zellen zwischen Patientenkohorten und gesunden Blutspendern.

**4.3 Die CD73 Expression von B-Lymphozyten variiert je nach Differenzierungsgrad**



**Abbildung 6: Ein Anteil humaner B-Zell peripheren Blutes exprimiert CD73**

FACS Färbung einer Blutprobe eines gesunden Spenders. Ein Anteil der peripheren B-Zellen trägt das Ektoenzym CD73 auf seiner Oberfläche.

Bei der Analyse der Blutprobe eines gesunden Spenders zeigte sich, dass periphere B-Zellen zu einem großen Anteil CD73<sup>+</sup> waren (s. Abb. 6). In der Kohorte gesunder Blutspender waren im Mittel 73,86% der CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Zellen CD73<sup>+</sup>. Wie bereits oben beschrieben, erlaubte

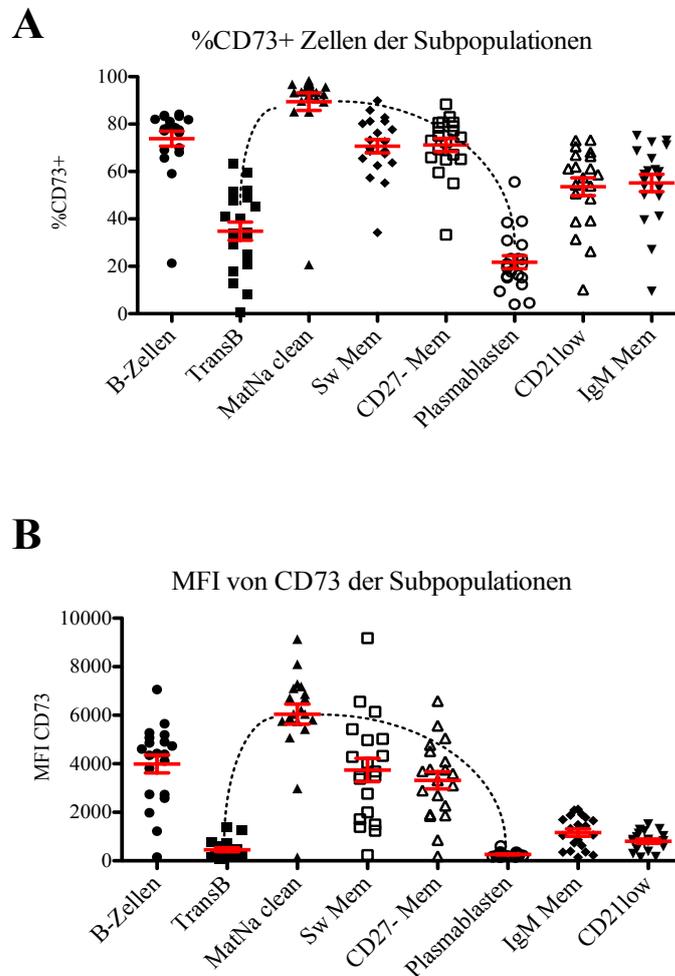
das Panel die Unterteilung CD19<sup>+</sup> B-Zellen in weitere Subpopulationen, deren CD73 Expression im Folgenden genauer analysiert wird.

Vergleicht man den Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen von allen B-Zellen mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Subpopulationen, so fallen deutliche Unterschiede auf: Während Plasmablasten beispielsweise kaum CD73<sup>+</sup> Zellen enthielten, waren fast 80% der CD27- Mem Zellen CD73<sup>+</sup> (s. Abb. 7/A). Insbesondere die CD21<sup>low</sup> Zellen gesunder Spender zeigten eine inhomogene Verteilung des Anteils CD73<sup>+</sup> Zellen. Um einen Vergleich des Anteils CD73<sup>+</sup> Zellen zwischen unterschiedlichen Kohorten zu ermöglichen, wurde die MatNa clean Population erarbeitet. Zum Gating dieser Kohorte wurden alle Marker des Panels bis auf CD73 genutzt. Diese CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27-CD24<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup>CD21<sup>+</sup> Population umfasste reife naive B-Zellen, aus denen CD21<sup>low</sup> Zellen ausgeschlossen wurden (s. Abb. 4). Der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen unter MatNa clean lag im Mittel bei 89,48 Prozent und variierte unter den gesunden Spendern nur in geringem Maße. Lediglich ein einzelner Ausreißer zeigte einen Anteil von 20,70% an CD73<sup>+</sup> MatNa clean Zellen.

Bei Betrachtung von Subpopulationen unterschiedlicher Differenzierungsgrade fiel ein Verlauf der CD73 Expression auf: Unreife TransB trugen CD73 im Mittel in geringerem Maße auf ihrer Oberfläche als reife MatNa clean Zellen. Zugleich variierte der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen unter TransB stark. Reife Naive (MatNa clean) Zellen zeigten den höchsten Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen. Populationen, die die Keimzentrumsreaktion durchlaufen hatten (Sw Mem, CD27- Mem), beherbergten einen geringeren Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen als MatNa clean. Fast ausdifferenzierte Plasmablasten trugen kaum CD73 auf ihrer Oberfläche (Mittelwert des Anteils positiver Zellen: 21,71%). Insgesamt zeigte sich im Rahmen der Reifung ein Anstieg der CD73 Expression von unreifen Zellen zu MatNa clean, der unter weiter differenzierten Zellen wieder abnahm (s. Abb. 7/A, gestrichelte Linie). Dieser Verlauf zeigte sich noch deutlicher bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für CD73 innerhalb der unterschiedlichen Subpopulationen (s. Abb. 7/B). Die in Abbildung 7 gezeigten Daten wurden in einem Experiment am gleichen Tag erhoben, was den Vergleich der MFI erlaubte.

Auch ein Teil der IgM Mem waren CD73<sup>+</sup> (Mittelwert: 55,16%). Bei Betrachtung der MFI zeigte sich aber, dass diese Expression im Vergleich zu anderen Populationen nur sehr gering ausgeprägt war (s. Abb. 7/A+B). CD21<sup>low</sup> Zellen zeigten in Bezug auf ihre CD73 Expression eine ähnliche Verteilung wie IgM Mem Zellen. Da sowohl IgM Mem als auch CD21<sup>low</sup> Zellen

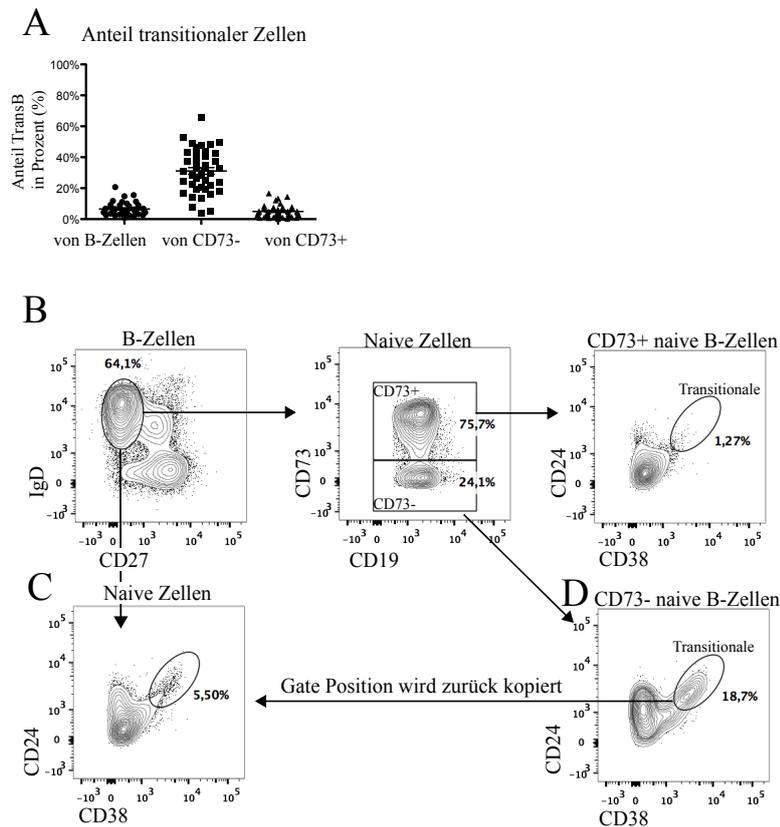
keiner Differenzierungsstufe zweifelsfrei zugeordnet werden konnten, wurden die Populationen hier nicht als Teil des Verlaufes der CD73 Expression dargestellt.



**Abbildung 7: B-Zell Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer CD73 Expression**

Illustration des Anteils CD73+ Zellen und der Fluoreszenzintensität von CD73 an unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen in Proben gesunder Spender. (A) Anteil CD73+ Zellen an unterschiedlichen Subpopulationen. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität von CD73 in unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen.

#### 4.4 Die Analyse der CD73 Expression transistionaler B-Zellen deckt eine dritte Subpopulation transistionaler B-Zellen (T3) auf

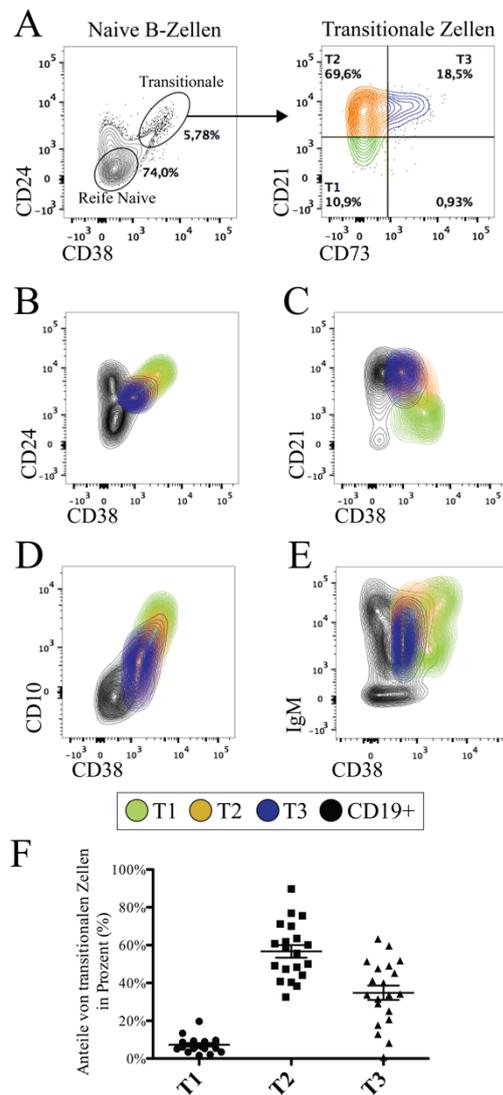


**Abbildung 8: Transitionale Zellen waren unter CD73- naiven Zellen angereichert**

FACS Analyse peripheren Blutes gesunder Spender mit Fokus auf den Anteil transistionaler Zellen in Abhängigkeit von CD73. (A) Transitionale Zellen sind unter CD73- B-Zellen angereichert. (B) Transitionale Zellen sind unter CD73- naiven B-Zellen angereichert, was zum Determinieren der Position des TransB Gates genutzt werden kann.

Bei Betrachtung der CD73 Expression unterschiedlicher B-Zell Subpopulationen wurde ersichtlich, dass TransB CD73 mit hoher Varianz und nur in geringem Maße exprimierten (s. Abb. 7/A+B). Der Anteil von TransB unter CD73<sup>-</sup> B-Zellen unterschied sich deutlich von dem unter CD73<sup>+</sup> B-Zellen: Während TransB unter CD73<sup>-</sup> B-Zellen angereichert waren, fanden sich unter CD73<sup>+</sup> B-Zellen nur einige wenige TransB (s. Abb. 8/A). Setzte man nun ein Gate auf die IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> Naive Zellen und trug sowohl CD73<sup>+</sup>, als auch CD73<sup>-</sup> Naive B-Zellen getrennt für CD24 und CD38 auf, zeigte sich, dass innerhalb der CD73<sup>+</sup> naiven B-Zellen kaum TransB zu finden waren (s. Abb. 8/B). Im Unterschied dazu demarkierte sich eine Population von TransB innerhalb der CD73<sup>-</sup> Naiven Zellen (s. Abb. 8/D). Das Gating von TransB als CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup> Zellen ist subjektiv und ungenau, wenn die CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup> von den CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> MatNa abgetrennt werden sollen, weil sich TransB in dieser Darstellung nicht klar von MatNa abgrenzen (s. Abb. 8/C). Die Darstellung

CD73<sup>-</sup> naiver Zellen für CD24 und CD38 ermöglichte nun eine objektivere Bestimmung der Position des TransB Gates, weil sich die Zellen in dieser Darstellung klarer abgrenzten (s. Abb. 8/D). Diese Position dieses Gates wurde nun zurück auf alle Naiven Zellen kopiert, um die Position des TransB Gate festzulegen (s. Abb. 8/C). Diese Gating Strategie wurde in der gesamten Arbeit für die Bestimmung der Position des TransB Gate verwendet.

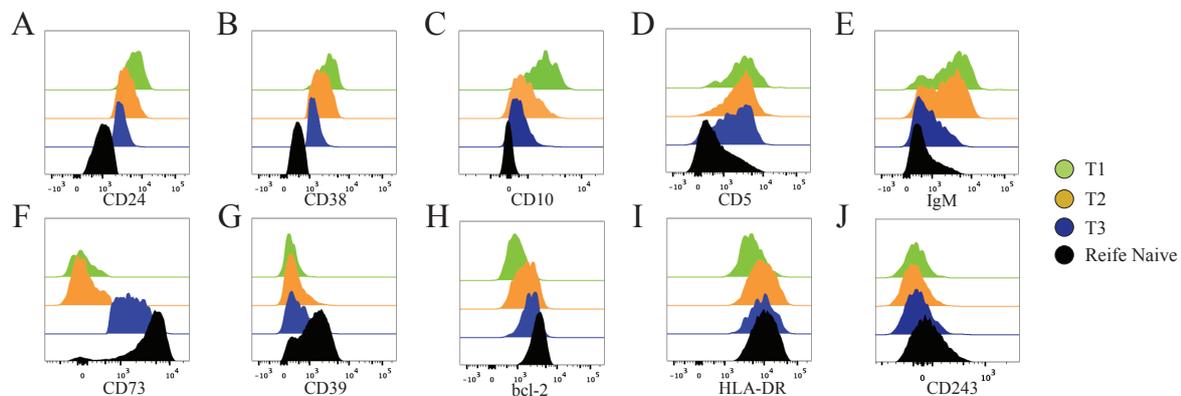


**Abbildung 9: CD73 markiert eine dritte Subpopulation transistionaler Zellen**

Analyse von Subpopulationen transistionaler Zellen für unterschiedliche Differenzierungsmarker in FACS Analysen peripheren Blutes gesunder Spender. (A) TransB können mit Hilfe von CD21 und CD73 in drei Subpopulationen unterteilt wurden: CD21<sup>niedrig</sup>CD73<sup>-</sup> (T1, grün), CD21<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> (T2, orange) und CD21<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (T3, blau). Die Gesamtheit der B-Zellen ist zum Vergleich schwarz dargestellt. (B-E) Die Subpopulationen unterscheiden sich auch in ihrer Expression von gängigen Markern für TransB. (F) T1, T2 und T3 nehmen unterschiedliche Anteile von TransB in Analysen von Blutproben gesunder Spender (n=20) ein.

TransB können im peripheren Blut anhand ihrer Expression von CD24 und CD38 identifiziert werden (nach Sims et al. 2005). Anhand ihrer CD21 Expression können diese Zellen weiter in CD21-niedrig exprimierende T1-Zellen (T1) und CD21-hoch exprimierende T2-Zellen (T2) unterteilt werden, was aufeinanderfolgende Stufen der Reifung widerspiegelt (Suryani et al. 2009). Wurden die nach der oben gezeigten Strategie eingegrenzten TransB für CD21 und CD73 aufgetragen, fanden sich neben den beschriebenen T1 Zellen auch CD21-hochpositive T2-Zellen, die sich in eine CD73<sup>-</sup> und eine CD73-niedrig-positive Fraktion unterteilten. Diese CD21<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> TransB werden hier als T3 Zellen bezeichnet (s. Abb. 9/A). Neben der Marker-Kombination CD24/CD38 wurden von einigen Autoren auch andere Kombinationen zur Identifizierung von TransB genutzt. Unter anderem fanden die Marker CD10, CD38 und IgM hierfür Verwendung (Cuss et al. 2006; Wehr et al. 2007). T2 Zellen exprimierten weniger CD24 und CD38 als T1 Zellen (Suryani et al. 2009). T3 Zellen exprimierten ihrerseits noch weniger CD24 und CD38 als T2 Zellen. Trotzdem lag die CD24 und CD38 Expression von T3 Zellen gemäß der Gating Strategie (s. Abb. 9/A) über der von MatNa. Dass T3 Zellen CD38 in geringerem und CD21 in höherem Maße als T1 Zellen exprimierten, wurde auch bei Betrachtung von CD21 gegen CD38 deutlich (s. Abb. 9/C). Die CD10 Expression nahm, wie die von CD24 und CD38, von T1 über T2 zu T3 Zellen ab. Während T1 und T2 Zellen CD10<sup>+</sup> waren, fanden sich unter den T3 Zellen auch CD10<sup>-</sup> Zellen (s. Abb. 9/D). Auch die IgM Expression fiel von T1 zu T3 Zellen ab. Trotzdem exprimierten alle drei Subpopulationen durchgehend IgM, was sich beim Vergleich mit den Gesamt-B-Zellen zeigte (s. Abb. 9/E). Insgesamt gliederten sich T3 Zellen also in ihrer Expression dieser Differenzierungsmarker zwischen T2 und reifen Naiven Zellen ein.

Betrachtet man die Anteile der unterschiedlichen Subpopulationen von transitionalen Zellen von gesunden Spendern, so zeigt sich eine relativ homogene Verteilung der Subpopulationen. T1 Zellen machten mit im Mittel 7,83% der Zellen den kleinsten Anteil aus. Der Anteil an T2 Zellen war mit im Mittel 67,81% am höchsten, während T3 Zellen im Mittel 23,08% der Zellen einnahmen (s. Abb. 9/F).



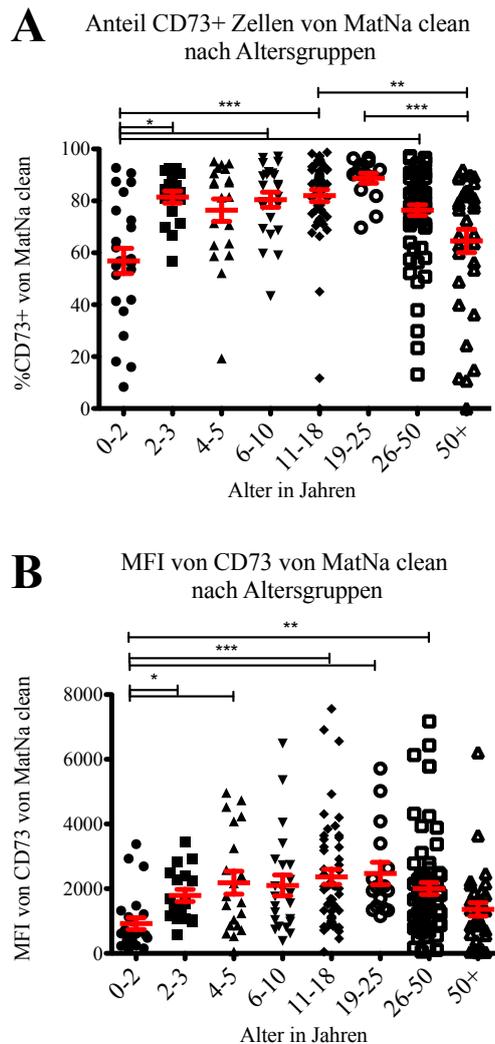
**Abbildung 10 : Der Phänotyp von T3 Zellen ist reifer als der von T2 Zellen, aber trotzdem noch unreif**

Repräsentative FACS Färbungen peripheren Blutes von gesunden Spendern zur Analyse unterschiedlicher Differenzierungsmarker auf Subpopulationen von transitionalen B-Zellen im Vergleich mit reifen naiven B-Zellen. (A-E) Die Intensität der Expression der Marker CD24, CD38, CD10, CD5 und IgM fällt von T1 über T2 zu T3 Zellen. T3 Zellen exprimieren dennoch mehr CD24, CD38, CD10, CD5 und IgM als Reife Naive Zellen. (F) T3 Zellen exprimieren CD73 in geringerem Maße als Reife Naive Zellen. (G) Die Subpopulationen transistionaler Zellen exprimieren zum Großteil kein CD39. (H) Die bcl-2 Expression steigt von T1 zu Reifen Naiven Zellen graduell an. (I) Sowohl transitionale, als auch Reife naive Zellen sind HLA-DR+. (J) TransB sind im Unterschied zu Reifen Naiven Zellen CD243 negativ.

Um auszuschließen, dass es sich bei der von uns als T3 bezeichneten Population lediglich um reife Naive B-Zellen handelte, die versehentlich durch das Gate für TransB-Zellen mit erfasst worden waren, wurde der Differenzierungsgrad der T3 Zellen mit Hilfe weiterer Differenzierungsmarker genauer analysiert (s. Abb. 10). Die Expression von CD24, CD38 und CD10 nahm wie oben beschrieben von T1 über T2 über T3 zu reifen Naiven Zellen immer weiter ab (s. Abb. 10/A-C). T3 unterschieden sich bezüglich ihrer CD24 und CD38 Expression schon deshalb von Reifen Naiven Zellen, weil diese beiden Marker Teil der Gating Strategie waren (s. Abb. 4). CD10 wird, wie auch die Marker CD24 und CD38, auf unreifen B-Zellen exprimiert (Cuss et al. 2006). Das Expressionsniveau von CD10 auf T3 Zellen lag unter dem von T2 Zellen, aber deutlich über dem von Reifen Naiven Zellen. Ein Anteil von T3 Zellen war CD10<sup>-</sup>, während alle T1 und T2 Zellen CD10<sup>+</sup> waren. Es ist

bekannt, dass zumindest transitionale T1 Zellen im Unterschied zu reifen Zellen CD5 exprimieren (Sims et al. 2005). Passend dazu exprimierten alle drei hier beschriebenen Subpopulationen transistionaler Zellen CD5, während der größte Teil Reifer Naiver Zellen CD5<sup>-</sup> war (s. Abb. 10/D). Sowohl Reife Naive, als auch transitionale B-Zellen exprimierten IgM (s. Abb. 9/E). Trotzdem zeigten sich bei näherer Betrachtung deutliche Unterschiede zwischen den Subpopulationen in der Intensität der IgM Expression: T1 und T2 Zellen waren IgM-hochpositiv, T3 Zellen und Reife naive Zellen hingegen IgM-niedrig-positiv, wobei die IgM-Expression der T3 Zellen immer noch höher war als die der reifen Naiven Zellen. Obwohl T3 Zellen anhand ihrer CD73 Expression identifiziert wurden, exprimierten sie CD73 in deutlich geringerem Maße als reife Zellen (s. Abb. 10/F). Es trug nur ein kleiner Anteil der T3 Zellen das Ektoenzym CD39 auf seiner Oberfläche (s. Abb. 10/G). Das intrazelluläre Protein bcl-2 vermittelt Schutz vor Apoptose (nach Merino et al. 1994). Interessanterweise wurde dieses Protein kaum in unreifen transistionalen, sehr wohl aber in reifen B-Zellen produziert. Passend dazu stieg die bcl-2 Expression von T1 über T2 und T3 zu reifen Naiven Zellen graduell an (s. Abb. 10/H). Sowohl transitionale, als auch reife Zellen waren HLA-DR<sup>+</sup> (s. Abb. 10/I). Der einzige in der Literatur beschriebene Marker, der transitionale B-Zellen klar von reifen Naiven Zellen abgrenzen soll, ist CD243. Hierbei handelt es sich um das Transmembranprotein ABCB1 (auch P-glycoprotein oder MDR-1), das den Transport unterschiedlichster Moleküle über die Zellmembran vermittelt. Transitionale Zellen wurden als CD243<sup>-</sup> beschrieben, während reife Naive Zellen CD243<sup>+</sup> sind (Wirths und Lanzavecchia 2005). Leider liefert der einzige verfügbare Antikörper-Klon nur Färbungen von geringer Intensität, weshalb eine Unterscheidung CD243<sup>+</sup> und CD243<sup>-</sup> Zellen schwerfällt. Dennoch konnten wir zeigen, dass alle drei transistionalen Subpopulationen CD243<sup>-</sup> waren, während Reife Naive Zellen CD243 in höherem Maße exprimierten (s. Abb. 10/J). Insgesamt lag die Expression von Differenzierungsmarkern von T3 Zellen zwischen der von transistionalen T2 Zellen und Reifen Naiven Zellen.

## 4.5 Die Expression von CD73 verändert sich mit dem Lebensalter



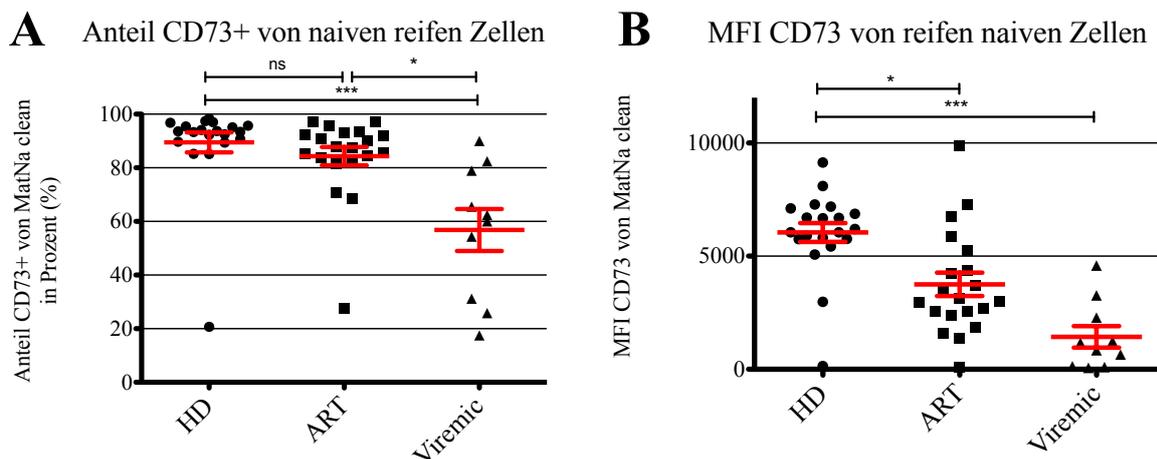
**Abbildung 11: Die CD73 Expression reifer Naiver Zellen verändert sich mit dem Lebensalter**

Der Anteil CD73+ von Reifen Naiven Zellen wurde untersucht, in dem die Patienten, deren Blutproben analysiert wurden, in unterschiedliche Altersgruppen aufgeteilt wurden. (A) Der jeweilige Anteil CD73+ Zellen von Reifen Naiven Zellen im peripheren Blut wurde im FACS gemessen und aufgetragen. (B) Die MFI der CD73 Expression wurde aufgetragen.

Der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen von Reifen Naiven Zellen ohne CD21<sup>low</sup> Zellen (MatNa clean) unterschied sich zwischen Patienten unterschiedlicher Altersgruppen. So nahm der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen bis zum jungen Erwachsenenalter signifikant zu. Insbesondere Säuglinge und Kleinkinder verfügten durchschnittlich nur über wenige CD73<sup>+</sup> Zellen. Im Alter fiel der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zum jungen Erwachsenenalter wieder signifikant ab. Da sich auch die Anteile der unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen mit dem Alter veränderten (s.u.), wurde hier der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen einer definierten Population (MatNa clean) für den Vergleich genutzt. Bei vergleichender Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten

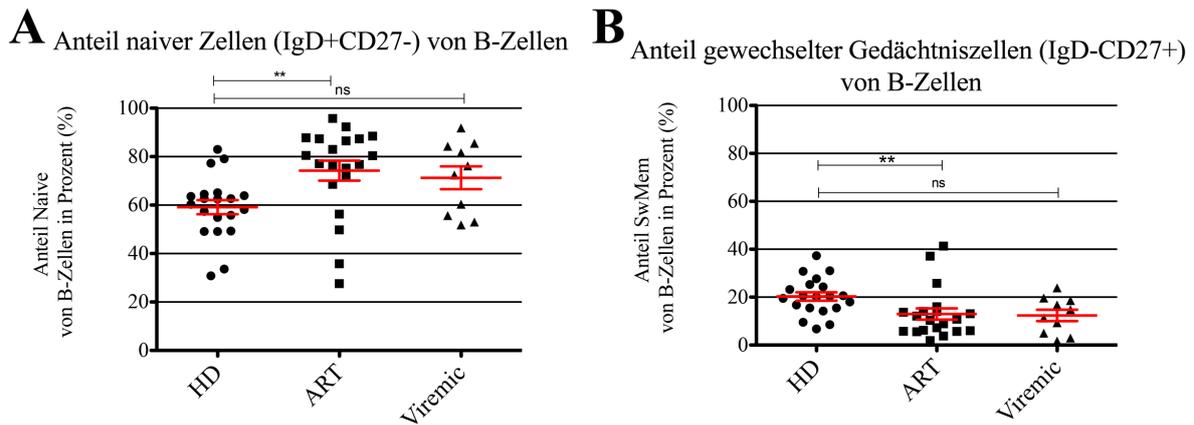
zeigten sich die gleichen Tendenzen wie bei Betrachtung der Anteile CD73<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 11/B). Allerdings wurden diese Daten über einen Zeitraum von über einem Jahr erhoben, in dem das genutzte FACS Gerät mehrfach gewartet und neu kalibriert wurde. Deshalb sind die gezeigten Daten für die MFI nur bedingt vergleichbar.

#### 4.6 Infektionen mit dem HI-Virus wirken sich auf die CD73 Expression und die Zusammensetzung der B-Zell Populationen aus



**Abbildung 12: HIV infizierte Patienten exprimieren weniger CD73 auf der Oberfläche von B-Zellen als gesunde Spender**  
 FACS Analyse von Gesunden Spendern (HD, n=20), HIV infizierten und antiretroviral therapierten Patienten (ART, n=20) und virämischen HIV infizierten Patienten ohne Therapie (Viremic, n=10). (A) Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen von reifen Naiven B-Zellen. (B) MFI CD73 von reifen Naiven Zellen.

Bei der Analyse der CD73 Expression von reifen Naiven B-Zellen in Blutproben von HIV infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern zeigten sich deutliche Unterschiede. Die CD73 Expression von HIV infizierten Patienten lag signifikant unter der von gesunden Spendern (s. Abb. 12/B). Die HIV Patienten konnten weiter in eine anti-retroviral therapierte (ART) und eine unbehandelte Kohorte (viremic) unterteilt werden. Der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen von reifen Naiven B-Zellen der ART-Kohorte unterschied sich nicht signifikant von dem gesunder Spender (s. Abb. 12/A). Trotzdem lag die Expressionsintensität von CD73 auf reifen Naiven Zellen im Mittel unter der von gesunden Spendern (s. Abb. 12/B). Obwohl die CD73 Expression auf reifen Naiven B-Zellen von virämischen Patienten sehr inhomogen verteilt war, zeigten sich hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zu gesunden Blutspendern: Sowohl der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen, als auch die Expression von CD73 auf reifen Naiven Zellen war deutlich vermindert (s. Abb. 12/A+B). Des Weiteren zeigten sich Unterschiede in der Zusammensetzung des B-Zell Pools von HIV-Patienten im Vergleich mit gesunden Spendern: HIV-Patienten zeigten u.a. Veränderungen im Anteil Naiver und klassengewechselter B-

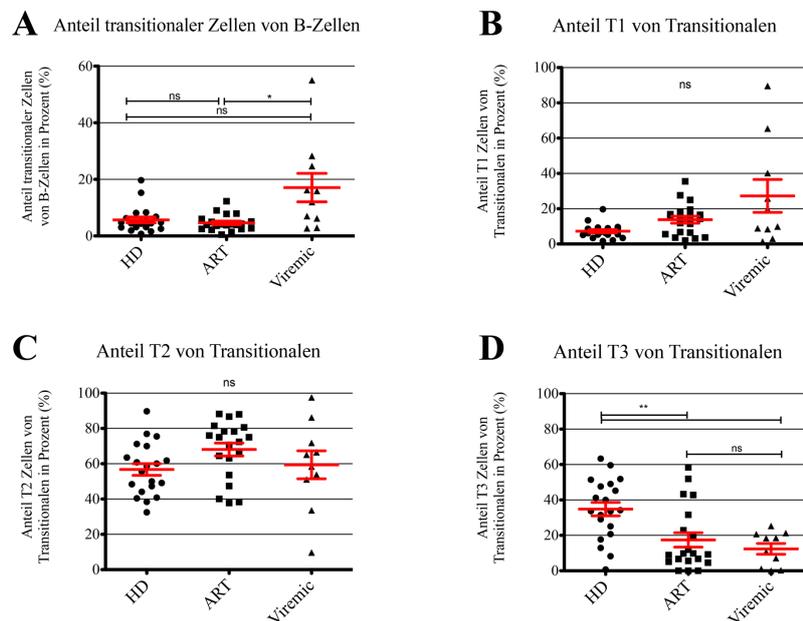


**Abbildung 13: HIV infizierte Patienten haben veränderte Anteile naiver und klassengewechselter Gedächtniszellen im Vergleich mit gesunden Spendern**

FACS Analyse peripheren Blutes von Gesunden Spendern (HD, n=20), therapierten HIV Patienten (ART, n=20) und virämischen HIV Patienten (Viremic, n=10). (A) Der Anteil naiver (IgD+CD27-) Zellen von B-Zellen ist unter therapierten HIV Patienten signifikant erhöht. (B) Der Anteil gewechselter Gedächtniszellen (IgD-CD27+) ist bei therapierten HIV Patienten signifikant geringer als bei gesunden Spendern.

Zellen. Der Anteil naiver B-Zellen an den Gesamt-B-Zellen im peripheren Blut war bei HIV Patienten unter ART Therapie signifikant höher als bei gesunden Spendern (s. Abb. 13/A). Eine ähnliche, allerdings nicht signifikante Tendenz fand sich auch beim Vergleich von virämischen Patienten mit gesunden Spendern (s. Abb. 13/A). Zugleich war der Anteil klassengewechselter Gedächtniszellen an den Gesamt-B-Zellen bei therapierten HIV Patienten geringer als bei gesunden Spendern. Die gleiche Tendenz zeigte sich beim Vergleich von virämischen HIV Patienten mit gesunden Spendern (s. Abb. 13/B). Gemeinsam mit Kim et al. konnten wir zeigen, dass diese Beobachtungen mit einer eingeschränkten Fähigkeit zum Klassenwechsel in-vitro von peripheren B-Zellen von HIV Patienten im Vergleich mit Zellen von gesunden Spendern korrelierten (Kim et al. 2017).

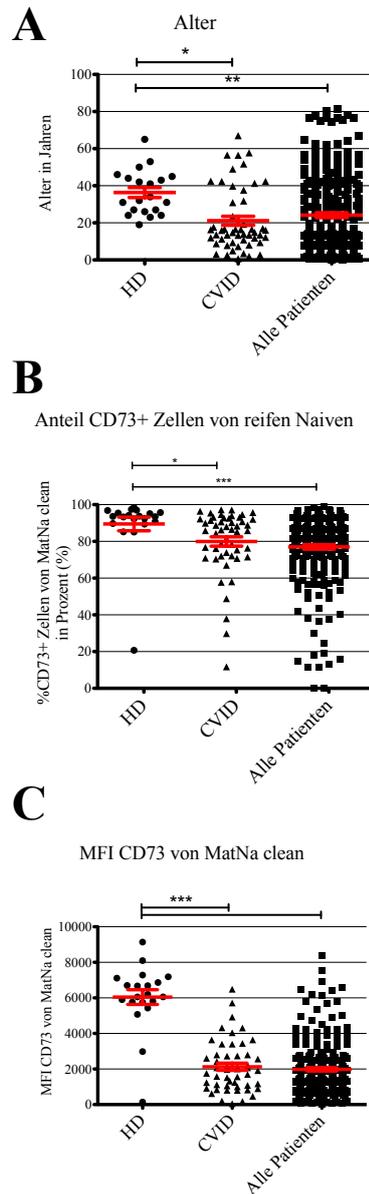
Wie oben beschrieben, konnte mit Hilfe von CD73 eine dritte Population transitionaler B-Zellen identifiziert werden, deren Phänotyp reifer als der von T2 Zellen, aber zugleich unreifer als der von MatNa Zellen war. Bei Betrachtung des Anteils von TransB an den Gesamt-B-Zellen im Blut von gesunden Spendern und HIV Patienten fiel auf, dass virämische Patienten einen signifikant höheren Anteil unreifer Zellen aufwiesen als antiretroviral therapierte Patienten. Im Vergleich zu gesunden Spendern zeigten virämische Patienten lediglich die nicht-signifikante Tendenz zu einem erhöhten Anteil transitionaler Zellen (s. Abb. 14/A). Passend zur Beobachtung, dass HIV Patienten weniger CD73 auf ihren reifen Naiven Zellen exprimierten, war der Anteil CD73<sup>+</sup> T3 Zellen an den TransB unter HIV Patienten signifikant niedriger als bei gesunden Spendern (s. Abb. 14/D). Die Anteile von T1 und T2 Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen HIV Patienten und gesunden Spendern (s. Abb. 14/B-C). Insgesamt präsentierte sich also auch das Kompartiment unreifer Zellen im peripheren Blut bei HIV Patienten verändert im Vergleich mit gesunden Spendern.



**Abbildung 14: HIV Patienten zeigen veränderte unreife B-Zell Populationen im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Spendern**

Analyse der Anteile transitionaler Zellen und ihrer Subpopulationen aus Proben peripheren Blutes von Gesunden Spendern (HD, n=20), therapierten HIV Patienten (ART, n=20) und virämischen HIV Patienten (Viremic, n=10). (A) Anteile transitionaler Zellen von B-Zellen. (B-D) Anteile der Subpopulationen von TransB (T1 (CD21<sup>low</sup>/CD73<sup>-</sup>), T2 (CD21<sup>high</sup>CD73<sup>-</sup>) und T3 (CD21<sup>high</sup>CD73<sup>+</sup>)) im Vergleich.

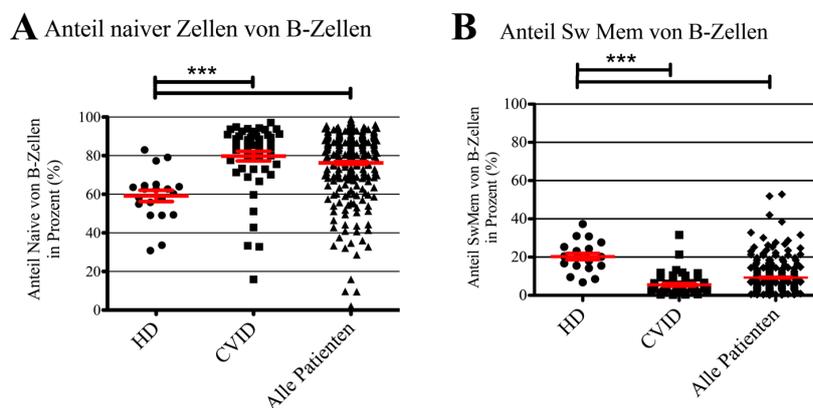
## 4.7 CVID Patienten zeigen Veränderungen in der Zusammensetzung ihres B-Zell Pools mit verminderter CD73 Expression der Zellen



### Abbildung 15: CVID Patienten zeigen eine verminderte Expression von CD73 auf reifen Naiven B-Zellen

Analyse der CD73 Expression und des Alters der CVID Kohorte (CVID, n=50) im Vergleich zu gesunden Spendern (HD, n=20) und allen Patienten (Pat, n=242). (A) Vergleich des Alters der unterschiedlichen Kohorten. (B-C) Analyse des Anteils CD73+ Zellen und der CD73 Expression reifer Naiver Zellen.

Innerhalb der untersuchten Patientenkohorte, deren Blutproben zur Lymphozyten-Phänotypisierung eingesandt wurden (Pat, n=242), fanden sich 50 Patienten mit diagnostizierter chronisch-variabler Immundefizienz (CVID). Weil Schena et al. die verminderte CD73 Expression auf den B-Zellen dieser Patienten mit einer verminderten Fähigkeit zum in-vitro Klassenwechsel in Zusammenhang bringen konnten, wurde diese Kohorte hier detailliert untersucht (Schena et al. 2013). Limitierender Faktor unserer Analyse war jedoch das niedrige Durchschnittsalter der CVID Kohorte (21,12 Jahre) im Vergleich zur Kohorte gesunder Spender (36,35 Jahre) (s. Abb. 15/A). Es zeigte sich, dass die CVID Kohorte sowohl einen signifikant geringeren Anteil an CD73+ Zellen von reifen Naiven B-Zellen, als auch eine signifikant verminderte Expression von CD73 auf reifen Naiven Zellen aufwies (s. Abb. 15/B-C).



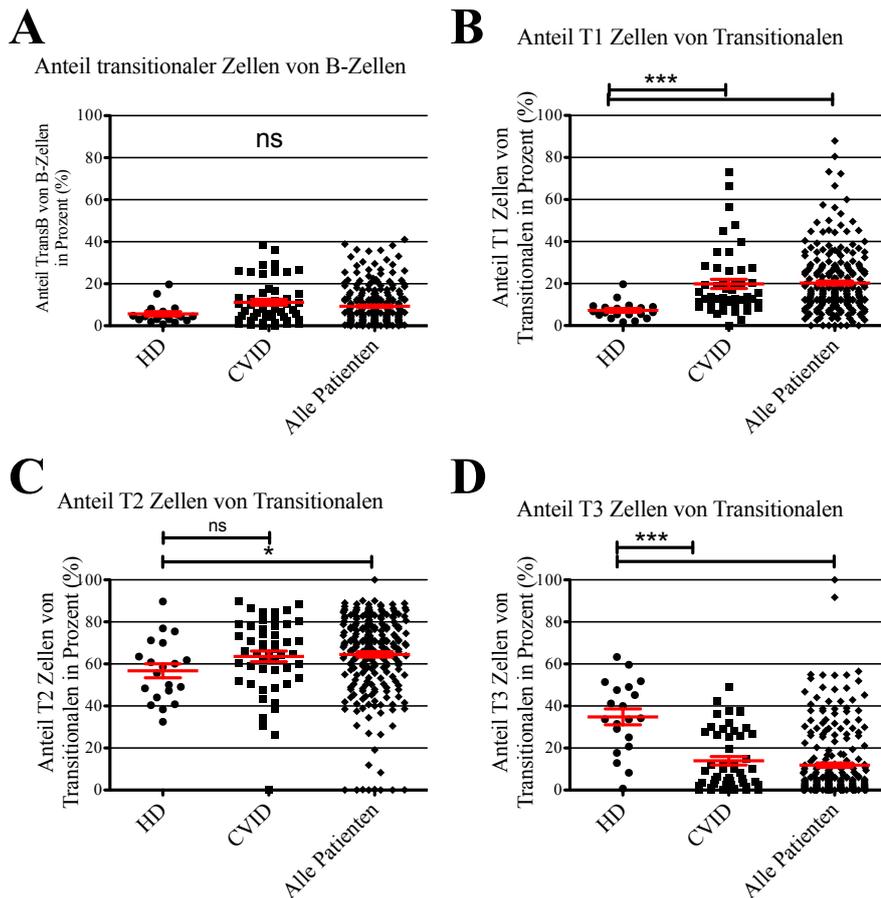
**Abbildung 16: CVID Patienten zeigen signifikante Veränderungen naiver und klassengewechselter Gedächtniszellen**

FACS Analyse der Anteile naiver und klassengewechselter Gedächtniszellen von peripheren Blutproben gesunder Spender (HD, n=20), Patienten mit chronisch variabler Immundefizienz (CVID, n=50) und Patienten, deren Proben zur Lymphozytenphänotypisierung eingesandt wurden (Pat, n=242). (A) Anteile naiver (IgD+CD27-) Zellen von B-Zellen. (B) Anteile gewechselter Gedächtniszellen (IgD-CD27+) von B-Zellen.

Betrachtet man nun die Gesamtheit der zur Lymphozytenphänotypisierung eingesandten Kohorte, die auch die CVID Kohorte enthält, so zeigten sich die gleichen signifikanten Tendenzen im Vergleich zu gesunden Spendern (s. Abb. 15/B-C). Zu beachten ist hierbei, dass es sich bei der CVID Kohorte um eine Teilkohorte der Pat-Kohorte handelt. Insgesamt zeigten sowohl die CVID, als auch die Patientenkohorte ähnliche Veränderungen der CD73 Expression von B-Zellen wie HIV Patienten (s.o.).

CVID Patienten zeigten, wie HIV Patienten auch, signifikant erhöhte Anteile Naiver Zellen und signifikant verminderte Anteile klassengewechselter Gedächtniszellen von B-Zellen im

Vergleich mit gesunden Spendern (s. Abb. 16/A-B). Die gleichen signifikanten Unterschiede konnten beim Vergleich der gesamten Patientenkohorte mit gesunden Spendern beobachtet werden (s. Abb. 16/A-B). Um die vergrößerte Kohorte Naiver Zellen näher zu untersuchen, wurden auch die Anteile und Subpopulationen transitionaler unreifer B-Zellen genauer betrachtet: Weder CVID Patienten noch die gesamte Patientenkohorte zeigte signifikante Veränderungen des Anteils transitionaler Zellen von B-Zellen im Vergleich mit gesunden Spendern (s. Abb. 17/A). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Zusammensetzung der transitionalen B-Zellen der CVID Patienten signifikant von der von gesunden Spendern: CVID Patienten hatten, wie die Gesamtheit der Patientenkohorte auch, einen signifikant erhöhten Anteil von T1 Zellen, einen unveränderten Anteil von T2 Zellen und signifikant erhöhte Anteile von T3 Zellen (s. Abb. 17/B-D). Ähnliche Tendenzen konnten auch bei der gesamten Patientenkohorte im Vergleich mit gesunden Spendern beobachtet werden (s. Abb. 17/B-D).

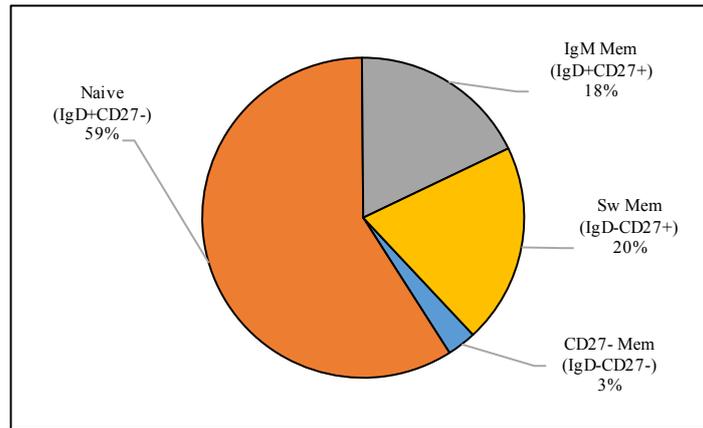


**Abbildung 17: CVID Patienten zeigen eine veränderte Zusammensetzung ihrer transitionalen Zellen**

Analyse von FACS Daten von peripheren Blutproben gesunder Spender (HD, n=20), CVID Patienten (CVID, n=50) und der Gesamtheit der eingesandten Patientenproben (Pat, n=242). (A) Anteile transionaler Zellen von B-Zellen. (B-C) Anteile der Subpopulationen von TransB (T1 (CD21low/CD73-), T2 (CD21high/CD73-) und T3 (CD21high/CD73+)) im Vergleich.

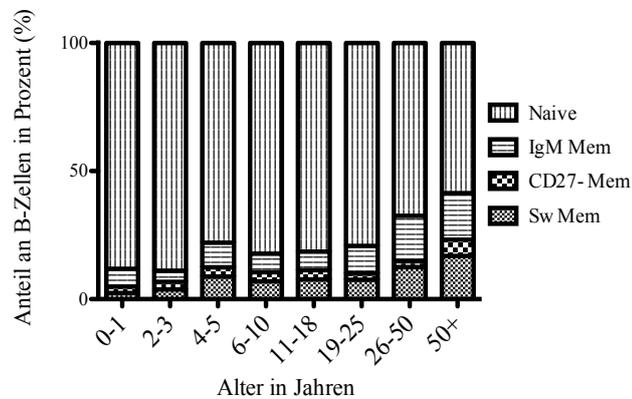
#### 4.8 Die Zusammensetzung der B-Zell Population im peripheren Blut verändert sich mit dem Lebensalter

In gesunden Spendern (n=20) mit einem Durchschnittsalter von 36,35 Jahren nahmen Naive B-Zellen (CD45+CD19+IgD+CD27-) mit durchschnittlich 59% den größten Anteil ein. Das zweitgrößte Kompartiment bestand mit durchschnittlich 20% aus klassengewechselten Gedächtniszellen (Sw Mem, CD45+CD19+IgD-CD27+), die auch geringe Anteile von Nur-IgM-Gedächtniszellen und Plasmablasten enthalten können. Neben IgM-Gedächtniszellen (IgM Mem, IgD+CD27+; durchschnittlich 18%) fand sich ein geringer Anteil (durchschnittlich 3%) von CD27- Gedächtniszellen (CD27- Mem, IgD-CD27-) (s. Abb. 18).



**Abbildung 18: Durchschnittliche Zusammensetzung der B-Zell Population im peripheren Blut von gesunden Spendern**  
 20 Blutproben von gesunden Spendern wurden mit FACS analysiert. Die durchschnittliche Zusammensetzung der B-Zell Population aufgeteilt nach IgD/CD27 wird hier gezeigt.

Verteilung der Populationen von IgD vs. CD27 nach Altersgruppen

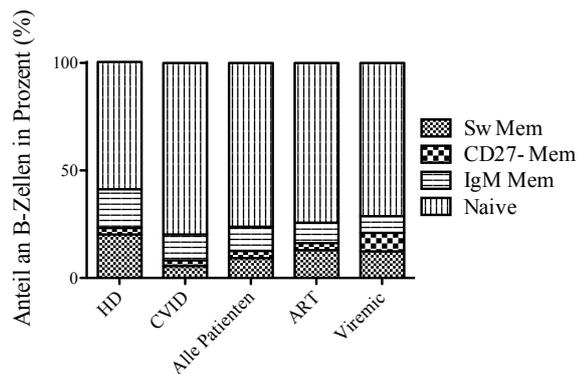


**Abbildung 19: Die Zusammensetzung der peripheren B-Zellen veränderte sich mit zunehmendem Alter**  
 Anteile der B-Zell Subpopulationen nach Aufteilung für IgD/CD27 in unterschiedlichen Altersgruppen der Patientenkohorte (n=242).

Das Kompartiment der Naiven Zellen beinhaltet auch die transitionalen Zellen, die durchschnittlich 5,69% der B-Zellen einnahmen (s. Abb. 17/A). Die Zusammensetzung des B-Zell Pools veränderte sich mit zunehmendem Lebensalter: Während der Anteil Naiver Zellen immer weiter abnahm, nahmen alle Populationen der Gedächtniszellen zu (s. Abb. 19), wobei die Zunahme der CD27- Gedächtniszellen vor allem in der Altersgruppe 50+ auffiel (s. Abb. 19).

Vergleicht man nun die Verteilung der unterschiedlichen Subpopulationen von gesunden Spendern mit den Patientenkohorten, so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede: Insgesamt fand sich in allen Patientenkohorten eine Erhöhung des Anteils Naiver (IgD+CD27-) Zellen, womit eine Erniedrigung des Anteils von Gedächtniszellen (CD27+ & IgD-CD27-) einherging. Trotzdem unterschieden sich die Kohorten in der Zusammensetzung der Populationen von Gedächtniszellen: CVID Patienten hatten nur einen geringen Anteil an Sw Mem Zellen (IgD-CD27+) (Mittelwert: 5,5%, s. auch Abb. 14/B). Diese Population war ebenfalls bei beiden HIV Kohorten im Vergleich mit gesunden Spendern vermindert. Während der Anteil an CD27- Gedächtniszellen (IgD-CD27-) innerhalb der virämischen Kohorte im Vergleich mit gesunden Spendern deutlich größer war, traf diese Tendenz nicht auf antiretroviral therapierte HIV Patienten zu. Auch die Durchschnittswerte der gesamten Patientenkohorte für die verschiedenen Anteile von B-Zellen unterschieden sich von denen gesunder Spender. Auch hier fand sich eine Vergrößerung des Anteils Naiver Zellen im Vergleich mit gesunden Spendern (s. Abb. 20).

Verteilung der Subpopulationen von IgD vs CD27  
in unterschiedlichen Patientenkohorten

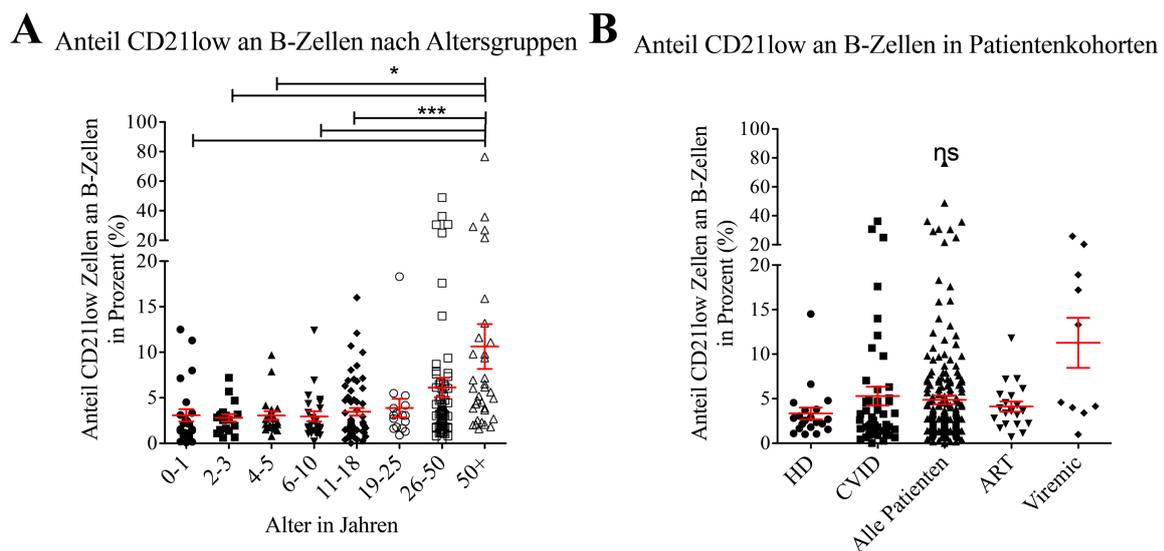


**Abbildung 20: Die Zusammensetzung der B-Zellen im peripheren Blut unterschied sich deutlich zwischen unterschiedlichen Patientenkohorten und gesunden Blutspendern**

Darstellung der nach IgD/CD27 eingeteilten Populationen als Anteile von B-Zellen nach Patientenkohorten.

#### 4.9 Der Anteil an CD21low Zellen nimmt mit steigendem Lebensalter zu

Mit zunehmendem Lebensalter wuchs der Anteil an CD21low Zellen von B-Zellen signifikant an. Während der Anteil dieser Zellen bis zum 25. Lebensjahr unter 4% lag, stieg er in der Altersgruppe 50+ auf im Mittel 10,63% der B-Zellen an (s. Abb. 21/A). Vergleich man nun die unterschiedlichen Patientenkohorten mit gesunden Spendern, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 21/B). Es fiel allerdings auf, dass die Anteile von CD21low Zellen zum Teil sehr inhomogen verteilt waren (s. Abb. 21/B).



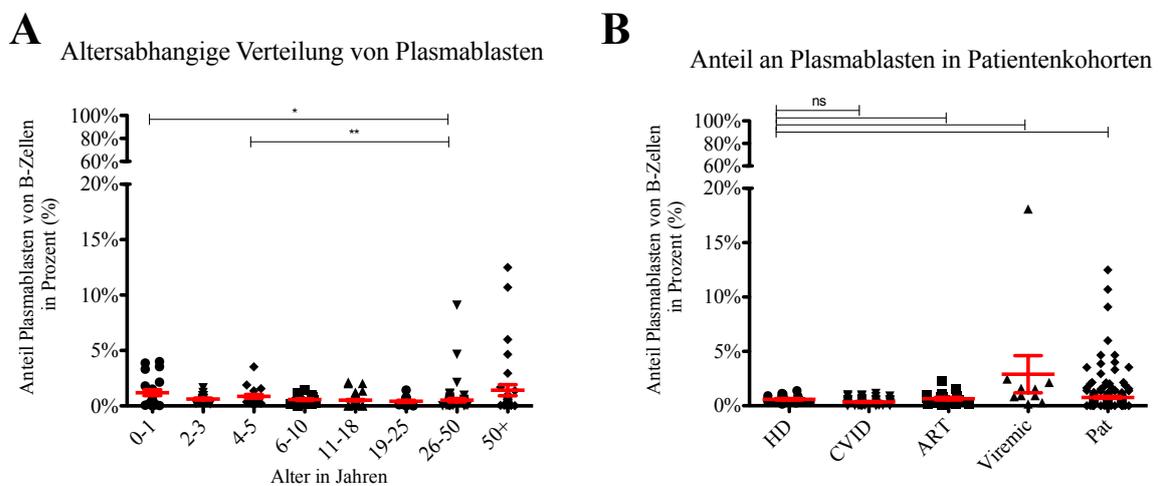
**Abbildung 21: Analyse des Anteils an CD21low Zellen von B-Zellen im peripheren Blut nach Alter und in unterschiedlichen Patientenkohorten.**

Dargestellt ist der Anteil von CD21low Zellen an den peripheren B-Zellen in (A) verschiedenen Altersgruppen der gesamten Patientenkohorte (Pat, n=242) und (B) unterschiedlichen Kohorten: CVID (n=50), ART (n=20), Viremic (n=10), alle Patienten (n=242), und gesunden Spendern (HD, n=20).

#### 4.10 Plasmablasten machen altersunabhängig nur einen geringen Anteil der B-Zellen im peripheren Blut aus

Plasmablasten machten bei gesunden Spendern im Mittel 0,6% der peripheren B-Zellen aus (s. Abb. 22/B). Der Anteil von Plasmablasten war im Säuglings- und Kleinkindalter zwar signifikant höher als der von Patienten im Alter von 26-50 Jahren, lag auch hier aber im Mittel nur bei 1,2 bzw. 0,9% (s. Abb. 22/A).

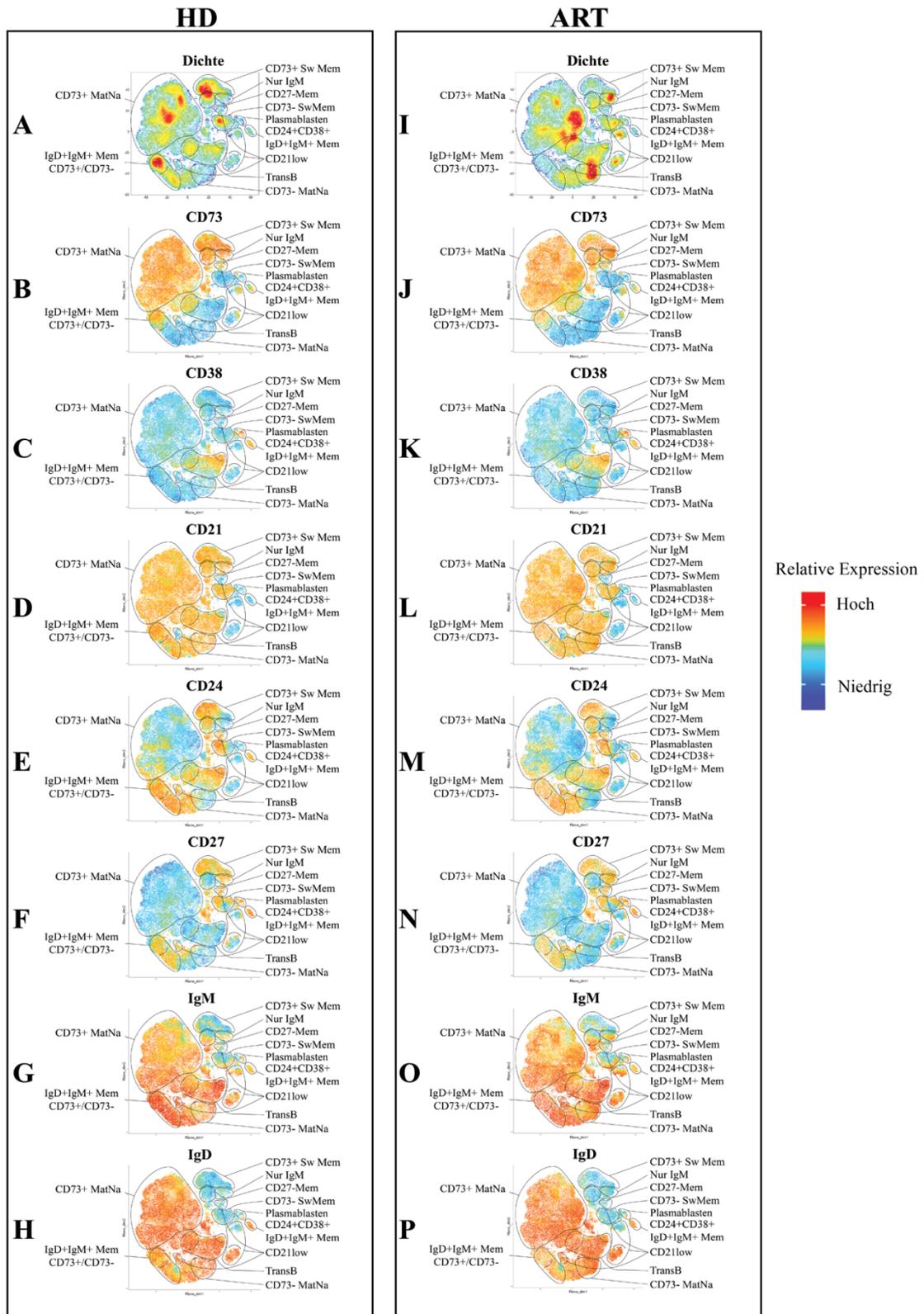
Vergleich man die untersuchten Patientenkohorten mit gesunden Spendern, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf den Anteil von Plasmablasten (s. Abb. 22/B). Lediglich die Kohorte der zur Lymphozytenphänotypisierung eingesandten virämischen HIV Patienten zeigte einen einzelnen Ausreißer mit einem Anteil von 18,1% Plasmablasten (s. Abb. 22/B).



**Abbildung 22: Analyse des Anteils von Plasmablasten an B-Zellen im peripheren Blut nach Alter (A) und in unterschiedlichen Patientenkohorten (B)**

Dargestellt ist der Anteil von Plasmablasten an den peripheren B-Zellen in (A) verschiedenen Altersgruppen der gesamten Patientenkohorte (Pat, n=242) und (B) unterschiedlichen Kohorten: CVID (n=50), ART (n=20), Viremic (n=10), alle Patienten (n=242), und gesunden Spendern (HD, n=20).

## 4.11 Der Algorithmus tSNE findet ähnliche B-Zell Populationen wie das subjektive Gating

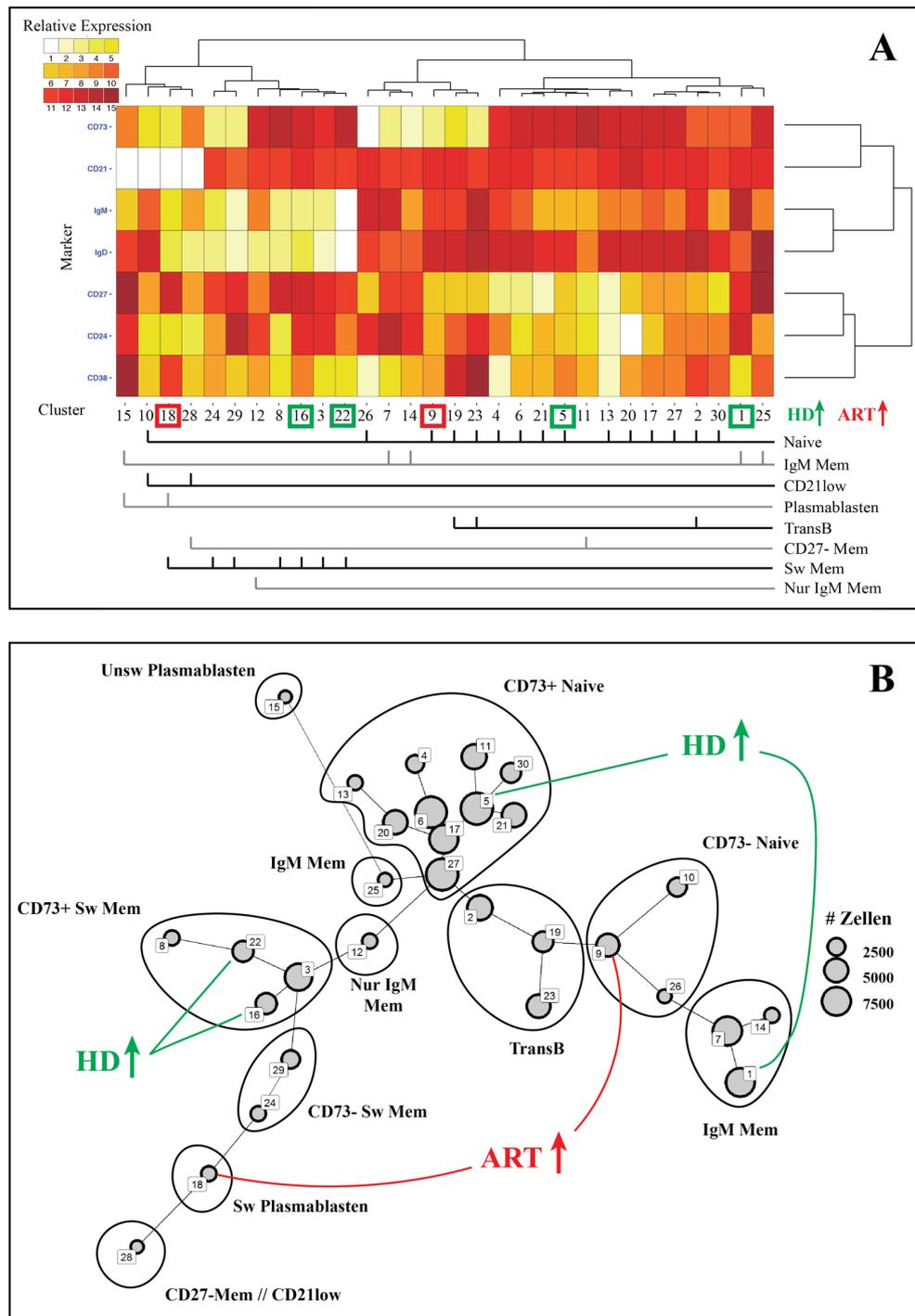


**Abbildung 23: Der Algorithmus tSNE findet ähnliche B-Zell Populationen wie das subjektive Gating**  
 Die FACS Daten von 19 Proben aus der HD\_IgM und 15 Proben aus der ART\_IgM Gruppe wurden mit Hilfe von tSNE analysiert. Die identifizierten Populationen wurden mit schwarzen Linien umrandet. Farbkodierte tSNE Plots von gesunden Spendern (A-H) und von ART Patienten (I-P).

Um eine hypothesenunabhängige Definition der B-Zell Subpopulationen zu erreichen, wurden die FACS-Daten von 19 Proben aus der HD\_IgM und 15 Proben aus der ART\_IgM Gruppe zunächst mit Hilfe von tSNE analysiert. Diese Methode erlaubt die Reduktion hochdimensionaler Daten auf eine zweidimensionale Darstellung. Jeder Zelle wird in dieser Darstellung eine Position zugewiesen, die so berechnet ist, dass sich in allen Dimensionen ähnelnde Zellen in Nachbarschaft angeordnet werden. Die daraus resultierende Abbildung kann nun nach Zelldichte oder Expressionsstärke farbkodiert dargestellt werden (s. Abb. 23). Innerhalb der resultierenden Zellwolke konnten anhand der unterschiedlichen Marker-Expression unterschiedliche Subpopulationen von B-Zellen identifiziert werden (s. Abb. 23/A-I). Die verschiedenen Anteile der Zellwolke wurden im Rahmen der Auswertung anhand ihres Phänotyps bekannten B-Zell Populationen zugeordnet (s. Abb. 23/schwarze Linien). Einige der beschriebenen Populationen wurden von tSNE nach ihrer CD73 Expression in Subpopulationen aufgeteilt (s. Abb. 23/A). Dies traf neben der Sw Mem und der IgM Mem Population auch auf CD21low und MaNa Zellen zu. Während die Nur-IgM und CD27- Mem Zellen in die Nähe der SwMem Population sortiert wurden, fanden sich IgM Mem Zellen auf der Gegenseite der Abbildung (s. Abb. 23/A). Die im subjektiven Gating als homogene Population abgegrenzten CD21low Zellen wurden von tSNE auf vier einzeln stehende Zellcluster aufgeteilt (s. Abb. 23/A). Im Zentrum der Abbildung fand sich eine Wolke von TransB Zellen, die anhand ihrer IgD, CD27, CD24 und CD38 Expression identifiziert werden konnten. Unterteilte man diese Wolke nochmals mit Hilfe der Marker CD21 und CD73, so ergaben sich 3 Subpopulationen, die den in den Abbildungen 6 und 7 identifizierten Populationen T1 (CD19+IgD+CD27-CD24+CD38+CD21lowCD73-), T2 (CD19+IgD+CD27-CD24+CD38+CD21highCD73-) und T3 (CD19+IgD+CD27-CD24+CD38+CD21highCD73+) glichen (s. Abb. 23/A-G). Der größten Zellpopulation (CD73+ MatNa) schlossen sich die TransB Zellen bündig an (s. Abb21/A). Während die T3 Population in direkter Nachbarschaft zu CD73+ MatNa Zellen angeordnet wurde, lagen die T2 und T1 Zellen weiter von dieser Population entfernt (s. Abb. 23/A). CD73- MatNa Zellen wurden in der direkten Nähe der T2 und IgM Mem Zellen einsortiert (s. Abb. 23/A). Plasmablasten wurden nahe den CD73- Sw Mem Zellen eingeordnet (s. Abb. 23/A). Eine stark abgegrenzte Population von CD24+CD38+IgD+IgM+CD27+ Zellen wurde in direkte Nachbarschaft zu den Plasmablasten gesetzt (s. Abb. 23/C-H). Unterschiede beim Vergleich zwischen HD und ART Kohorte wurden besonders bei Betrachtung der nach Dichte farbkodierten Plots ersichtlich (s. Abb. 23/A+I). ART Patienten zeigten eine größere Dichte

an CD73- MatNa, CD21low und CD27- Mem Zellen, während HD eine größere Dichte an CD73+ Sw Mem, CD73- Sw Mem, T3 und CD73+ IgM Mem aufwies (s. Abb. 23/A+I).

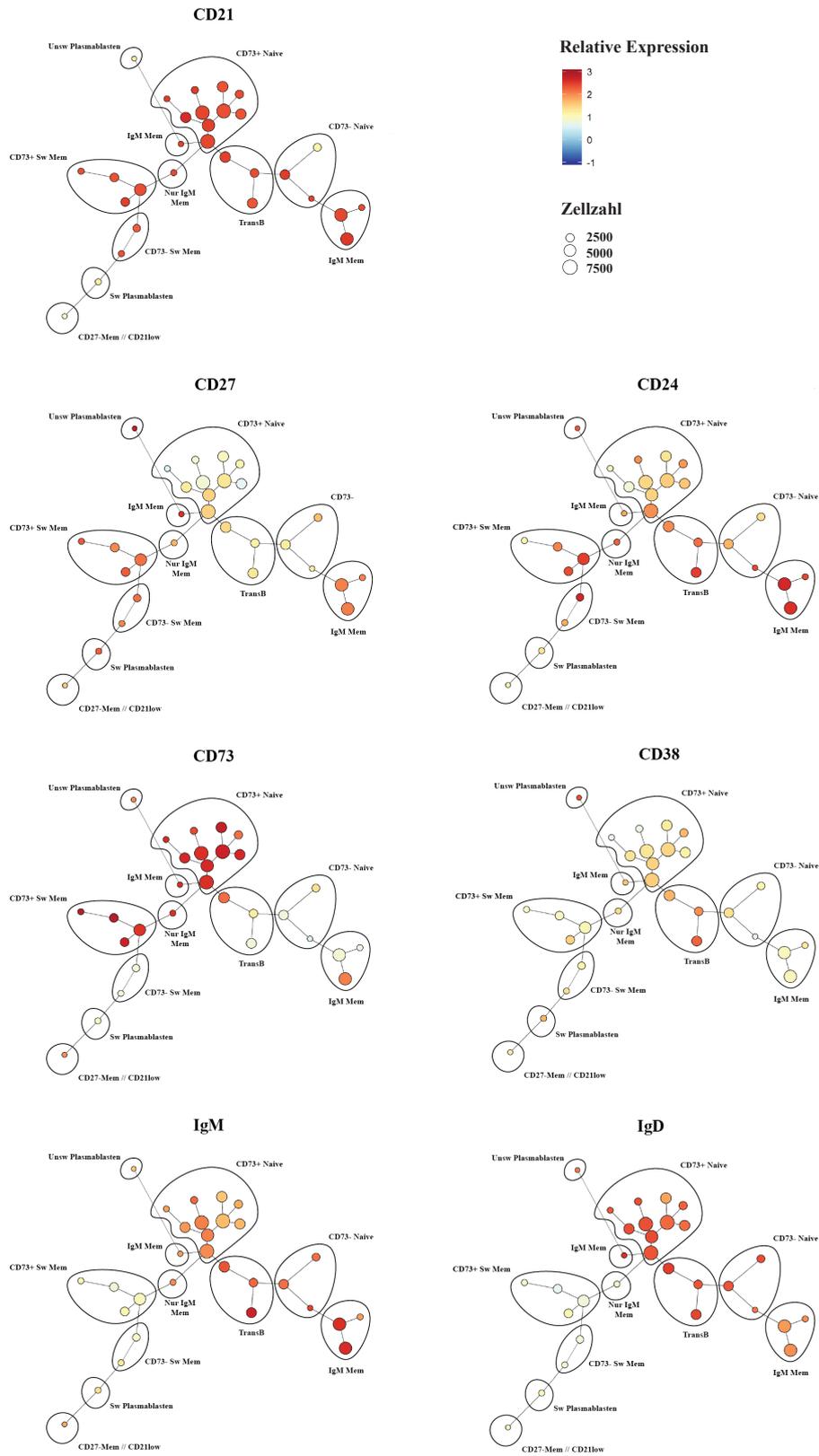
#### 4.12 SPADE deckt signifikante Unterschiede zwischen gesunden Spendern und antiretroviral therapierten HIV Patienten auf



**Abbildung 24: SPADE deckt signifikante Unterschiede zwischen gesunden Spendern und antiretroviral therapierten HIV Patienten auf**

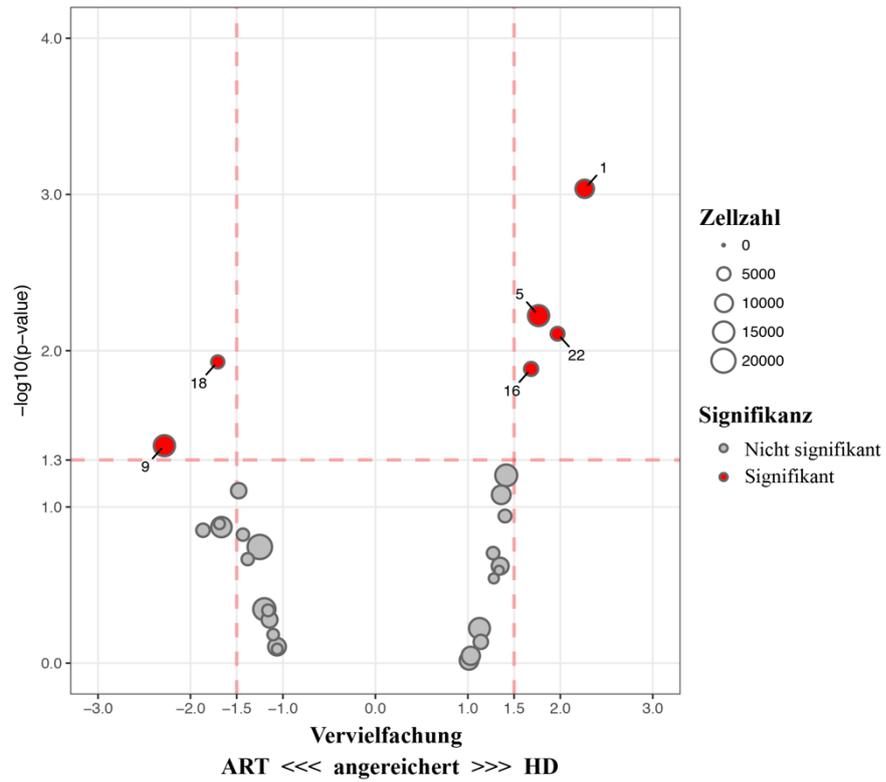
SPADE Analyse von FACS Daten von 19 HD\_IgM und 15 ART\_IgM Patienten. (A) Heatmap der 30 gefundenen Zellcluster mit farbkodierter Darstellung der relativen Expression der untersuchten Marker. Jedes Cluster wurde mit einer Zahl bezeichnet und anhand des Phänotyps subjektiv einer oder mehreren B-Zell Subpopulationen zugeordnet. Grün markierte Cluster waren unter HD im Vergleich zu ART Patienten signifikant vergrößert, rot markierte Cluster waren unter ART Patienten im Vergleich zu HD signifikant vergrößert. (B) Darstellung des resultierenden minimalen Spannbaums der gesunden Spender (Architektur bei ART gleich, Daten nicht gezeigt). Die Zellcluster wurden manuell B-Zell-Subpopulationen zugeordnet (schwarze Linien). Grün markierte Cluster waren unter HD im Vergleich zu ART Patienten signifikant vergrößert, rot markierte Cluster waren unter ART Patienten im Vergleich zu HD signifikant vergrößert.

Die Analyse mit SPADE konnte 30 Zellcluster identifizieren, die sich in Größe und Phänotyp voneinander unterschieden (s. Abb. 24/A+B). Es ist zu betonen, dass hier zur besseren Darstellung relative und nicht absolute Expressionen der Marker farbkodiert als Heatmap dargestellt wurden (s. Abb. 24/A und Abb. 25). Durch Betrachtung der Phänotypen konnte jedes gefundene Zellcluster einer oder mehreren B-Zell Subpopulation zugeordnet werden (s. Abb 22/A/schwarze und graue Linien und vgl. Abb. 25). Es fanden sich 15 Cluster Naiver Zellen, die auch TransB und CD21 Zellen umfassten. Außerdem konnten zwei Zellcluster von CD21low Zellen identifiziert werden, die sich vor allem in ihrer IgD und CD73 Expression unterschieden. Des Weiteren wurden drei TransB Populationen identifiziert, von denen zwei Populationen CD73- (Nr. 19 und 23) und eine CD73int (Nr. 2) war (s. Abb. 24/A). Die CD73- TransB Populationen unterschieden sich nur geringfügig in Hinblick auf ihre CD24 und CD38 Expression. Alle identifizierten TransB Cluster waren CD21+ (s. Abb. 24/A). Die sieben Sw Mem zugeordneten Cluster umfassten CD73- (Nr. 18, 24, 29) und CD73+ Cluster (Nr. 8, 16, 3, 22). Zwei der CD73- Sw Mem Cluster wurden auf Grund ihrer CD38 Expression den Plasmablasten zugeordnet (Nr. 15, 18). Während Cluster 18 IgD- war, exprimierten die Zellen aus Cluster 15 IgD (s. Abb. 24/A). Auch Nur-IgM (Nr. 12), IgM Mem (Nr. 15, 7, 14, 1, 25) und CD27- Mem Zellen (Nr. 28, 11) konnten zugeordnet werden. SPADE hat innerhalb der HD und der ART Kohorte die gleichen Cluster identifiziert und zwischen den beiden Kohorten verglichen. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede: Die Cluster 18 und 9 waren bei ART Patienten signifikant vergrößert. Innerhalb der HD Kohorte waren die Cluster 16, 22, 5 und 1 signifikant vergrößert (s. Abb. 26). Die mithilfe der Heatmap zugeordneten Populationen wurden anschließend im von SPADE erstellten minimalen Spannbaum als schwarze Linien eingetragen (s. Abb. 24/B, vgl. Abb. 25). Die Größe der Cluster im Spannbaum spiegelt die Anzahl der Zellen in jedem Cluster wider (s. Abb. 24/B). Im Zentrum des Spannbaums fanden sich TransB Zellen, denen sich links CD73+ Naive Zellen anschlossen. Das zwischen TransB und CD73+ Naiven Zellen liegende Cluster 2 wurde anhand seines Phänotyps in der Heatmap T3 Zellen zugeordnet. Den Naiven Zellen schloss sich nun ein Cluster von IgM Mem Zellen (Nr. 25) mit entsprechenden Plasmablasten (Nr. 15) an. Ein anderer Zweig führte über Nur-IgM Zellen (Nr. 12) zu CD73+ Sw Mem Zellen. Von CD73+ Sw Mem Zellen ging nun ein Ast mit CD73- Sw Mem Zellen (Nr. 24, 29) ab, der Sw Plasmablasten und schließlich CD27- CD21low Zellen (Nr. 28) enthielt. Auf der rechten Seite gliederten sich den TransB die CD73- Naive Population an. In der direkten Nachbarschaft dieser CD73- Naive Population wurden IgM Mem Zellen eingeordnet (s. Abb. 24/B).



**Abbildung 25: Farbkodierte SPADE Bäume der gefundenen Cluster**

Nach Markern sortierte und nach relativer Markerexpression farbkodierte SPADE Bäume der gefundenen Cluster zur Veranschaulichung. Die gezeigten Zellzahlen beziehen sich auf die Kohorte gesunder Spender (HD).



**Abbildung 26: Vulkan-Plot der SPADE Cluster**

Gezeigt ist die relative Häufigkeit der Cluster im Vergleich zwischen antiretroviral therapierten Patienten (ART) und gesunden Spendern (HD) auf Basis eines unpaaren student's t-test. Im Vergleich zwischen den Kohorten signifikant angereicherte Cluster sind rot markiert.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Einschränkungen der durchgeführten Analyse**

Die gewonnenen FACS Daten beinhalten grundsätzlich nur die jeweils betrachteten Antigene. Bei jeder Analyse muss also berücksichtigt werden, dass eine Färbung anderer Antigene möglicherweise andere Erkenntnisse hervorgebracht hätte. Die Anzahl der gleichzeitig analysierbaren Antigene war bei dem von uns genutzten FACS Gerät auf acht beschränkt, weshalb nur bei begründetem Interesse zusätzliche Färbungen mit anderen Antigenen durchgeführt wurden. FACS Daten liefern im Allgemeinen nur relative Werte. Sie erlauben also nur anteilige und keine absoluten Aussagen über die Größe der erfassten Populationen. Des Weiteren basiert die vorliegende Untersuchung u.a. auf Daten aus Analysen von Blutproben von Patienten mit unterschiedlichen klinischen Fragestellungen und lässt deshalb nur bedingt Rückschlüsse auf entsprechende Daten von gesunden Spendern zu. Trotzdem bietet diese Kohorte die Möglichkeit der Unterteilung in unterschiedliche Altersgruppen und wurde deshalb hierfür genutzt. Für einige Analysen konnte auf Proben von gesunden Spendern zurückgegriffen werden, die allerdings nicht gleichaltrig mit der jeweiligen Patientenkohorte war.

### **5.2 Das erarbeitete FACS Panel erlaubte die Identifikation unterschiedlicher relevanter B-Zell Subpopulationen**

Das erarbeitete FACS Panel zur Analyse von peripheren Blutproben von Patienten im Zentrum für Diagnostik am Universitätsklinikum Eppendorf umfasste die acht Antigene CD27, IgD, CD38, CD21, CD24, CD19, CD73 und CD45. Das Panel erlaubt die Unterteilung von B-Zellen in Subpopulationen unterschiedlicher Differenzierungsstufen. So können neben unreifen TransB auch hochdifferenzierte Plasmablasten analysiert werden.

Die direkte klinische Relevanz der erfassten Populationen zeigt sich beispielsweise bei der Betrachtung der unterschiedlichen Klassifikationen für chronisch variable Immundefizienzen (CVID) Freiburg, Paris und Euroclass, die Anteile von B-Zell Populationen von Lymphozyten in Zusammenhang mit dem Auftreten von klinischen Manifestationen der Erkrankung bringen (Warnatz et al. 2002; Piqueras et al. 2003; Wehr et al. 2007). Diese Arbeiten zeigen den direkten klinischen Zusammenhang der Anteile von Sw Mem, Naiven, CD21<sup>low</sup> und TransB Zellen mit klinischen Manifestationen wie granulomatösen Erkrankungen, Splenomegalie,

Autoimmunphänomenen oder Lymphadenopathie. Allerdings beziehen die genannten Klassifikationen die Anteile der Populationen auf CD45<sup>+</sup> Lymphozyten (Warnatz et al. 2002; Piqueras et al. 2003; Wehr et al. 2007). Dies ist mit unserem Panel ebenfalls möglich, in unserer Auswertung wurden die Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen allerdings auf CD19<sup>+</sup> B-Zellen bezogen.

### **5.3 Das Alter von Patienten hatte Einfluss auf CD73 Expression und Verteilung der unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen**

Die CD73 Expression auf B-Zellen wurde unter Zuhilfenahme der MatNa clean Population untersucht. Diese Population von CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen, aus der CD21<sup>low</sup> Zellen ausgeschlossen wurden, ist mit den gegebenen Markern maximal eingegrenzt und umfasst ausschließlich reife Naive B-Zellen. Da sich die CD73 Expression zwischen unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen unterscheidet (s.u), wurde ein möglicher Einfluss des Lebensalters anhand der MatNa clean Population untersucht. Wir konnten zeigen, dass sowohl der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen als auch die Expression von CD73 auf MatNa clean Zellen innerhalb der Pat Kohorte bis zum jungen Erwachsenenalter (19-25 Lebensjahre) signifikant ansteigt, um dann wieder signifikant abzufallen (s. Abb. 11). Interessanterweise lag der durchschnittliche Anteil an CD73<sup>+</sup> MatNa clean Zellen bei Patienten im Alter von über 50 Lebensjahren mit 64,6% sogar unter dem von Kleinkindern (2-3 Lj.: Mittelwert: 81,46%). Passend dazu fiel bei Analysen der CD73 Expression von B-Zellen aus Nabelschnurblut auf, dass diese Zellen kein CD73 exprimierten (Pettengill und Levy 2016). Hierbei ist zu betonen, dass es sich bei den B-Zellen im Nabelschnurblut nach Interpretation der Autoren vornehmlich um Naive B-Zellen handelte (Pettengill und Levy 2016). Dies erklärt möglicherweise die gefundene geringe CD73 Expression in der Altersgruppe von 0-2 Jahren in unserer Studie. Eine andere Analyse aus dem Jahr 1980 untersuchte die CD73 Aktivität auf peripheren B-Zellen aus Blut von gesunden Spendern im Alter von unter bzw. über 60 Jahren. Hier zeigte sich passend zu unseren Ergebnissen, dass die CD73 Aktivität auf den B-Zellen der älteren Kohorte signifikant geringer war als bei der jüngeren Kohorte (Boss et al. 1980). Die hier gezeigten Ergebnisse sind also, obwohl sie auf Patientendaten basieren, mit der Literatur vereinbar und erweitern die publizierten Erkenntnisse über den Einfluss des Lebensalters auf die Expression von CD73 auf B-Zellen.

Mit steigendem Lebensalter der Patienten nahm der Anteil an CD19<sup>+</sup> B-Zellen an Lymphozyten signifikant ab (s. Abb. 5/A). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass sich die

Zusammensetzung des B-Zell Pools im peripheren Blut innerhalb der Pat Kohorte mit zunehmendem Alter stark veränderte. So nahm der Anteil naiver B-Zellen mit steigendem Alter ab, während die Anteile an SwMem, IgM Mem und CD27<sup>-</sup> Mem Zellen zunahmen (s. Abb. 19). Insgesamt akkumulierten mit steigendem Lebensalter also Zellpopulationen, die nach einem Antigenkontakt gereift waren. Da das menschliche Immunsystem mit zunehmendem Lebensalter immer mehr Kontakt zu unterschiedlichen Antigenen hat, verwundert dieses Ergebnis nicht. Obwohl der Anteil an SwMem Zellen mit dem Lebensalter zunahm, blieb der Anteil an Plasmablasten relativ konstant auf sehr niedrigem Niveau (im Mittel unter 2%) (s. Abb. 22). Der Anteil an CD21<sup>low</sup> Zellen nahm hingegen mit steigendem Alter signifikant zu. Dieser Anstieg könnte auf in CD21<sup>low</sup> zum Teil enthaltene CD27<sup>-</sup> Mem Zellen zurückzuführen sein. Dass CD21<sup>low</sup> Zellen auch CD27<sup>-</sup> Mem Zellen enthalten, zeigt sich bei Betrachtung der Ergebnisse der SPADE Analyse (s. Abb. 24/B). Funde zu Referenzwerten von B-Zell Populationen im peripheren Blut in der Literatur bestätigen die hier gezeigten altersabhängigen Veränderung der Zusammensetzung des B-Zell Pools (Morbach et al. 2010; Melzer et al. 2015; Berrón-Ruíz et al. 2016). Lediglich eine Analyse, die FACS Daten von gesunden Spendern zwischen 19 und 67 Jahren nur in zwei Altersgruppen (>44 Jahre, <44 Jahre) unterteilte, fand kaum Alterseinflüsse. Dies könnte auf die ungünstige Aufteilung der Kohorte zurückzuführen sein (Apoil et al. 2017). Es ist hervorzuheben, dass die hier gemessenen Werte auf einer inhomogenen Patientenkohorte basierten. Trotzdem stimmten sowohl gefundene altersabhängige Tendenzen, als auch relative Werte mit den beschriebenen Referenzwerten überein. Eine Analyse möglicher Effekte des Geschlechtes der Patienten auf die Verteilung der unterschiedlichen B-Zell Populationen lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Im Kontrast dazu konnte eine andere Untersuchung feststellen, dass Frauen in der untersuchten Kohorte gesunder Spender im Alter zwischen 40 und 79 Jahren signifikant höhere Anteile an B-Zellen von Lymphozyten aufwiesen (im Median 18,3% (Männer) vs. 20,8% (Frauen) (Melzer et al. 2015).

#### **5.4 Die CD73 Expression von B-Zellen hängt von ihrem Differenzierungsgrad ab**

Die differenzierte Betrachtung des Anteils CD73<sup>+</sup> Zellen in den unterschiedlichen Subpopulationen von B-Zellen zeigte deutliche Unterschiede auf (s. Abb. 7). Transitionale B-Zellen exprimierten CD73 nur in relativ geringem Maße und lieferten in Bezug auf den Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen eine sehr inhomogene Verteilung. Das höchste Expressionsniveau von CD73 war auf MatNa clean Zellen zu finden. Interessanterweise lagen der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen und

die Expressionsstärke des Markers auf Sw Mem und CD27<sup>-</sup> Mem Zellen deutlich unter dem von MatNa clean Zellen. Das Expressionsniveau von CD73 auf Plasmablasten lag wiederum deutlich unter dem der Sw Mem und CD27<sup>-</sup> Mem Zellen. CD21<sup>low</sup> Zellen umfassten auch einen hohen Anteil an CD73<sup>+</sup> Zellen, deren CD73 Expressionsstärke allerdings auf sehr niedrigem Niveau lag. Diese Beobachtung trifft gleichermaßen auch auf IgM Mem Zellen zu, die wie CD21<sup>low</sup> Zellen gesondert betrachtet wurden, weil weder CD21<sup>low</sup> noch IgM Mem Zellen einer klaren Differenzierungsstufe von B-Zellen zugeordnet werden konnten. Dass IgM Mem Zellen CD73 in geringerem Maße exprimieren als Naive B-Zellen, konnte bereits zuvor gezeigt werden (Vásquez et al. 2015).

Die Expression von CD73 hängt also von der Differenzierungsstufe der Zellpopulationen ab. Die Ergebnisse legen nahe, dass unreife B-Zellen im Zuge ihrer Reifung zu reifen Naiven Zellen CD73 hochregulieren. Zellen, die einen Antigenkontakt hatten, regulieren CD73 dann mit steigendem Differenzierungsgrad weitestgehend herunter. Die CD73 Expression erreicht ihr Maximum auf reifen Naiven Zellen, die im Rahmen ihrer weiteren Differenzierung zum Teil eine Keimzentrumsreaktion mit möglichem Klassenwechsel durchlaufen. Dies ist im Hinblick auf die These interessant, dass CD73 eine wichtige Rolle im Klassenwechsel von B-Zellen spielen könnte (Skena et al. 2013).

### **5.5 Die Analyse der CD73 Expression transistionaler B-Zellen deckte eine dritte Population transistionaler B-Zellen auf**

Die Analyse der CD73 Expression unterschiedlicher Subpopulationen führte zu der These, dass unreife TransB CD73 in geringerem Maße exprimieren als reife Naive Zellen, was daraufhin genauer innerhalb der Kohorte gesunder Spender analysiert wurde. Tatsächlich waren TransB unter den CD73<sup>-</sup> B-Zellen stark angereichert, aber zugleich war auch unter den CD73<sup>+</sup> B-Zellen eine Population von TransB detektierbar. Die Betrachtung CD73<sup>-</sup> Naiver Zellen führte zu einer neuen, objektiven Gating Strategie für TransB, die anschließend in der gesamten Arbeit Anwendung fand. Diese neue Strategie erleichterte die zuvor sehr subjektive Abgrenzung CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> transistionaler B-Zellen von CD24<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> reifen Naiven B-Zellen (s. Abb. 8). Bei Analyse der CD21 und CD73 Expression von TransB fanden sich drei Subpopulationen, die als T1 (CD21<sup>low</sup>CD73<sup>-</sup>), T2 (CD21<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>) und T3 (CD21<sup>+</sup>CD73<sup>int</sup>) bezeichnet wurden. Die Expression von Differenzierungsmarkern wie CD24, CD38, CD10 und IgM nahm von T1 und T2 über T3 zu MatNa immer weiter ab, was eine Differenzierung in dieser Reihenfolge nahelegt. Um T3 besser von T2 und MatNa Zellen unterscheiden zu

können, wurden weitere Differenzierungsmarker von B-Zellen untersucht: Während MatNa Zellen CD5<sup>-</sup> sind, exprimieren unreife B-Zellen diesen Marker (Sims et al. 2005). Dass T3 Zellen CD5<sup>+</sup> sind, zeigt gemeinsam mit der Tatsache, dass T3 Zellen ABCB1<sup>-</sup> sind und den intrazellulären Transkriptionsfaktor bcl-2 in höherem Maße exprimieren als reife Zellen, dass es sich bei T3 Zellen um eine unreife B-Zell Population handelt (Wirths und Lanzavecchia 2005; Merino et al. 1994).

Mit Hilfe von CD73 konnte also eine dritte Subpopulation von TransB identifiziert und klar von T2 Zellen abgegrenzt werden, deren Reifegrad zwischen dem von anderen Transitionalen und reifen naiven Zellen liegt. T3 Zellen sind CD39<sup>-</sup> und CD73<sup>+</sup>, exprimieren CD73 aber in deutlich geringerem Maße als reife Naive B-Zellen. Falls T3 Zellen zu MatNa Zellen ausdifferenzieren, könnten T3 Zellen also die erste Population in der B-Zell-Entwicklung sein, die CD73 exprimiert. Diese These könnte in Zukunft durch die Untersuchung von Zellen aus dem Knochenmark und der Milz gesunder Spender weiter untersucht werden. Bereits im Jahr 2001 wurden 3 Subpopulationen transitionaler B-Zellen in Mäusen anhand der Marker CD23 und IgM beschrieben: T1 (CD23-IgM<sup>high</sup>), T2 (CD23<sup>+</sup>IgM<sup>high</sup>) und T3 (CD23<sup>+</sup>IgM<sup>low</sup>) Zellen. Die Population humaner TransB-Zellen wurde hingegen im Unterschied zu reifen naiven Zellen als CD24, CD38, CD10, IgM und IgD exprimierende Zellen beschrieben, denen der von naiven Zellen exprimierte Transporter ABCB1 fehlt (nach Carsetti et al. 2004; Wirths und Lanzavecchia 2005). Nachdem Sims et al. bereits das humane Korrelat zu den T1 Zellen der Maus identifizieren konnten, definierten Suryani et al. humane T1 Zellen als CD21<sup>low</sup> und humane T2 Zellen als CD21<sup>high</sup> (Sims et al. 2005; Suryani et al. 2009). Dass diese Populationen aufeinanderfolgende Reifegrade widerspiegeln, konnte durch Analysen der B-Zell Rekonstitution nach B-Zell Depletion gezeigt werden (Suryani et al. 2009; Palanichamy et al. 2009). Dass eine dritte, reifere Population transitionaler B-Zellen im Menschen existiert, kündigte sich bereits mit den Ergebnissen von Lee et al. an, die eine CD5<sup>+</sup> Population von Zellen zeigten, die wie transitionale Zellen ABCB1<sup>-</sup> ist, die transitionalen Marker CD38 und CD10, aber nur in geringfügig höherem Maße als reife naive Zellen exprimiert (Lee et al. 2009). Schließlich analysierten Palanichamy et al. die B-Zell Rekonstitution nach B-Zell Depletion im peripheren Blut und konnten transitionale ABCB1<sup>-</sup> Zellen anhand ihrer CD24 und CD38 Expression in die drei Subpopulationen T1 (CD24<sup>+++</sup>CD38<sup>+++</sup>), T2 (CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup>) und T3 (CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) unterteilen. Alle drei Populationen konnten in-vitro zur Herunterregulation von CD10, IgM und ABCB1 stimuliert werden, was als Ausdifferenzierung zu reifen naiven Zellen interpretiert wurde. T3 Zellen unterschieden sich von T2 Zellen durch eine verminderte Expression von CD24, CD38, CD10

und IgM, wobei die CD24, CD38 und CD10 Expression noch über der von reifen naiven Zellen lag (Palanichamy et al. 2009). Die T3 Population konnte nach ihrer Expression von CD45RB<sup>MEM55</sup> und IgM weiter in zwei Subpopulationen unterteilt werden. Während die oben beschriebenen T3 Zellen IgM und CD45RB<sup>MEM55</sup> nur in geringem Maße exprimieren, wurde eine kleine Subpopulation identifiziert, die IgM und CD45RB<sup>MEM55</sup> hoch exprimiert und von den Autoren als T3' bezeichnet wird (Bemark et al. 2013). Bei CD45RB<sup>MEM55</sup> handelt es sich um ein Glykosylierungs-abhängiges Epitop von CD45RB, das vom Antikörperklon MEM-55 gebunden wird (nach Bažil et al. 1989). Die Autoren entwickeln die Hypothese, dass T3' Zellen zu Marginalzonen B-Zellen und T3 Zellen zu reifen naiven B-Zellen differenzieren (Bemark et al. 2013; Bemark 2015).

Der in dieser Arbeit als CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD73<sup>int</sup> IgM<sup>low</sup> CD10<sup>low</sup> CD5<sup>+</sup> bcl-2<sup>low</sup> ABCB1<sup>-</sup> beschriebene Phänotyp der T3 Population stimmt mit dem Phänotyp der von Palanichamy et al. beschriebenen T3 Zellen überein (Palanichamy et al. 2009). Die hier beschriebenen IgM<sup>low</sup> T3 Zellen entsprechen wahrscheinlich auch der T3 (und nicht der IgM<sup>high</sup> T3') Population von Bemark et al. (Bemark et al. 2013). Während T1 und T2 Zellen sich durch ihre CD21 Expression klar unterscheiden, fehlte bisher ein Marker zur klaren Differenzierung von T2 und T3 Zellen. Unsere Arbeit konnte nun CD73 als klares Merkmal zur Unterscheidung von T2 und T3 Zellen identifizieren. Auch in den durch tSNE erstellten Abbildungen konnte eine Population mit dem Phänotyp der hier definierten T3 Zellen identifiziert werden, die von tSNE zwischen T2 TransB und reife MatNa Zellen sortiert wurde. SPADE konnte ebenfalls ein Cluster (Nr. 2) identifizieren, das dem Phänotyp der hier definierten T3 Zellen entsprach. Interessanterweise wurde dieses Cluster im minimalen Spannbaum zwischen TransB und Naive Zellen sortiert, was die These, dass T3 eine Zwischenstufe der Reifung von TransB zu MatNa Zellen sind, unterstützt. Bei der Analyse der TransB-Zellen in den Patientenkohorten zeigte sich, dass CVID-, ART- und virämische Patienten einen signifikant geringeren Anteil von T3 Zellen an den TransB haben als gesunde Spender. Da gezeigt werden konnte, dass HIV und CVID Patienten auch insgesamt weniger CD73 auf ihren B-Zellen exprimieren, verwundert dieses Ergebnis nicht (Skena et al. 2013; Kim et al. 2017). Falls die Hochregulation von CD73 während der Ausdifferenzierung transitionaler Zellen ein zwingender Bestandteil der Zellreifung ist, könnten diese Beobachtungen eine Störung der B-Zell Reifung widerspiegeln.

### **5.7 Die Analyse von B-Zellen von CVID Patienten zeigte eine signifikant verminderte CD73 Expression und signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des B-Zell Pools der Patienten auf**

Innerhalb der Pat Kohorte fanden sich 50 Patienten mit diagnostiziertem chronisch-variablen Immundefekt (CVID). Auf eine Einteilung der CVID Kohorte nach den unterschiedlichen Klassifikationen in Subgruppen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit in dieser Arbeit verzichtet. Diese Kohorte wurde in Bezug auf die Zusammensetzung der B-Zellen im Blut und die CD73 Expression der MatNa clean Zellen mit einer Kohorte gesunder Spender verglichen. Die Kohorte gesunder Spender war allerdings mit im Mittel 36,35 Jahren deutlich älter als die CVID Kohorte (Mittelwert: 21,12 Jahre) (s. Abb. 15). Wie oben beschrieben konnten wir anhand von Patientenproben zeigen, dass die CD73 Expression ab dem 25. Lebensjahr abnimmt. Entsprechend müsste die Expression von CD73 auf den B-Zellen der CVID Patienten über dem Niveau der älteren Spenderkohorte liegen. Trotzdem lagen sowohl der Anteil CD73<sup>+</sup> B-Zellen als auch die MFI von CD73 bei der CVID Kohorte signifikant unter den Werten der Spenderkohorte (s. Abb. 15). Parallel dazu zeigten CVID Patienten signifikant erhöhte Anteile an naiven Zellen und signifikant verminderte Anteile an klassengewechselten B-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern. Bei Betrachtung des Anteils von TransB an den B-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Kohorten (s. Abb. 17). Trotzdem verfügten die CVID Patienten über signifikant erhöhte Anteile an T1 und signifikant verminderte Anteile an T3 Zellen an den TransB. Die verminderte Expression von CD73 auf B-Zellen wurde ebenfalls von Schena et al. beschrieben, und anschließend mit einer verminderten Fähigkeit zum Klassenwechsel *in vitro* bei CVID Patienten in Beziehung gesetzt (s.u) (Schena et al. 2013).

### **5.8 B-Zellen von HIV Patienten zeigen eine veränderte Zusammensetzung und exprimieren signifikant weniger CD73 als gesunde Spender**

Es wurden je zwei Kohorten von HD und ART und eine Kohorte virämischer HIV-Patienten untersucht. Bei der konventionellen Analyse der FACS Daten der HD, ART und viremic Kohorten fiel auf, dass die Intensität der CD73 Expression auf reifen Naiven B-Zellen von antiretroviral therapierten und virämischen HIV Patienten ohne Therapie im Vergleich mit gesunden Spendern signifikant erniedrigt war. Hierbei war der Anteil CD73<sup>+</sup> Zellen an den MatNa allerdings nur bei den virämischen Patienten signifikant geringer als der von gesunden Spendern (s. Abb. 12), während der Unterschied zwischen ART und HD nicht signifikant war.

Gemeinsam mit Kim et al. konnten wir zeigen, dass die Anteile der CD73<sup>+</sup> und CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Zellen an den B-Zellen auch bei anderen ART und virämischen HIV Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant vermindert waren. *In vitro* korrelierte der Anteil der CD73<sup>+</sup> B-Zellen von Patienten signifikant mit der Fähigkeit der Zellen extrazelluläres AMP *in vitro* abzubauen. Der beschriebene *in vitro* AMP Abbau konnte zusätzlich mit einem CD73 Inhibitor blockiert werden. Dieser funktionale Assay bewies, dass die verminderte CD73 Expression auf den B-Zellen dieser Patienten mit einer verminderten Fähigkeit zum Abbau von AMP einherging. Des Weiteren konnten die B-Zellen von virämischen HIV Patienten *in vitro* nicht zum Antikörper-Klassenwechsel angeregt werden, während B-Zellen von gesunden Spendern unter den gleichen Bedingungen einen Klassenwechsel zu IgG vollzogen (Kim et al. 2017).

Wir konnten also gemeinsam mit Kim et al. die verminderte CD73 Expression von B-Zellen von HIV Patienten mit einer verminderten Fähigkeit zum AMP-Abbau und zum *in vitro* Klassenwechsel in Verbindung bringen. Diese Beobachtungen passen gut zu den bereits bekannten Veränderungen von B-Zellen bei anderen (chronisch-variablen) Immundefekten (s.o.) (Skena et al. 2013).

Auch die Zusammensetzung des peripheren B-Zell-Pools von HIV infizierten Patienten zeigte deutliche Unterschiede zu gesunden Spendern. So hatten ART Patienten signifikant erhöhte Anteile Naiver und signifikant verminderte Anteile klassengewechselter B-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern. Diese Veränderungen zeigten sich auch beim Vergleich von virämischen Patienten mit gesunden Spendern, allerdings lediglich als nicht-signifikante Tendenzen (s. Abb. 13). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen in den Proben von virämischen Patienten sehr inhomogen verteilt waren. Womöglich hätte eine größere Stichprobengröße hier zu einem signifikanten Ergebnis geführt. Dass HIV-infizierte Individuen verminderte Anteile von Gedächtnis-B-Zell-Populationen aufweisen, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden (nach Moir und Fauci 2013). Des Weiteren war der Anteil unreifer transitionaler B-Zellen bei virämischen Patienten im Vergleich zu ART Patienten signifikant erhöht, was ebenfalls gut mit den Ergebnissen anderer Studien vereinbar ist (nach Moir und Fauci 2013). Die weitere Untersuchung der Zusammensetzung des transitionalen B-Zell-Kompartiments bei HIV Patienten konnte zeigen, dass virämische HIV Patienten tendenziell (nicht signifikant) erhöhte Anteile von unreiferen T1 und signifikant geringere Anteile von T3 Zellen hatten (s. Abb.14). Die gleichen Veränderungen konnten, wenn auch etwas milder ausgeprägt, in der ART

Kohorte beobachtet werden. Erhöhte Anteile von TransB korrelierten in einer anderen Untersuchung zwar negativ mit der CD4-Zellzahl und damit dem Fortschreiten der HIV Infektion, waren aber auch bei idiopathischer CD4-Lymphopenie bei nicht-HIV Infizierten beobachtbar. Auf Grund dieser Beobachtung entwickelten die Autoren der entsprechenden Übersichtsarbeit die These, dass Veränderungen von transitionalen Zellen auf die verminderte CD4 Zellzahl und nicht primär auf die Virämie zurückzuführen seien (nach Moir und Fauci 2013).

Auch die Analyse der an Stelle von CD45 mit IgM gefärbten HD\_IgM und ART\_IgM Kohorten identifizierte signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten. Im Vergleich zu gesunden Spendern hatten ART Patienten signifikant geringere Zellzahlen der Cluster 5, 1, 22 und 16. Hierbei handelte es sich um CD73<sup>+</sup> Naive, IgM Mem und zwei Cluster von Sw Mem Zellen. Die Zellzahlen der Cluster 9 (CD73<sup>-</sup> Naive) und 18 (klassengewechselte Plasmablasten) waren bei ART Patienten im Vergleich zur gesunden Spenderkohorte signifikant größer (s. Abb. 24).

Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der subjektiven Analyse vereinbar: In der subjektiven Analyse zeigte sich bei ART eine signifikant verminderte CD73 Expression Naiver B-Zellen einhergehend mit signifikant erhöhten Anteilen Naiver B-Zellen im Vergleich mit gesunden Spendern. Die SPADE Analyse zeigte ebenfalls, dass ART Patienten über weniger CD73<sup>+</sup> Naive und mehr CD73<sup>-</sup> Naive Zellen als HD verfügen. Des Weiteren war der Anteil der CD73<sup>+</sup> Sw Mem Zellen an den B-Zellen in der SPADE Analyse bei ART Patienten signifikant geringer als bei gesunden Spendern. Das passt zu den Ergebnissen der subjektiven Analyse, wo der Anteil an Sw Mem Zellen innerhalb der ART Kohorte signifikant geringer war als in der HD Kohorte. Dass ART Patienten außerdem signifikant geringere Anteile an IgM Mem Zellen aufwiesen, zeigte sich ebenfalls in der subjektiven Analyse. Dort war der Anteil an IgM Mem Zellen bei ART Patienten im Vergleich zu dem von gesunden Spendern vermindert (s. Abb. 20). Auch diese Ergebnisse sind insgesamt gut mit den Ergebnissen anderer Autoren vereinbar (nach Moir und Fauci 2013). Des Weiteren konnten in der subjektiven Analyse keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf den Anteil von Plasmablasten innerhalb der B-Zellen gefunden werden. Lediglich virämische Patienten zeigten die nicht-signifikante Tendenz zu erhöhten Anteilen von Plasmablasten. Dass virämische HIV Patienten im Unterschied zu ART Patienten tatsächlich über erhöhte Anteile von Plasmablasten verfügen, konnte an anderer Stelle gezeigt werden (nach Moir und Fauci 2013). Interessanterweise zeigte die SPADE Analyse signifikant erhöhte Anteile von

klassengewechselten Plasmablasten bei ART Patienten auf. Dieser Unterschied konnte in der subjektiven Analyse nicht detektiert werden. Hier wurden die Plasmablasten allerdings auch nicht weiter unterteilt.

Insgesamt ähneln sich die Ergebnisse der konventionellen und der SPADE Analyse also und sind gut mit der publizierten Literatur vereinbar. Trotzdem wurden die Daten mittels SPADE differenzierter und unvoreingenommener betrachtet, was weitere, zuvor nicht detektierte, Unterschiede zwischen den B-Zellen von ART Patienten und HD ans Licht brachte.

### **5.9 Der mit SPADE erstellte minimale Spannbaum zeichnet die B-Zell Differenzierung nach**

Der SPADE Algorithmus definierte bei der Analyse der Blutproben der HD\_IgM und ART\_IgM Kohorten 30 Cluster von Zellen objektiv nach ihrer Ähnlichkeit (s. Abb. 24). Jedes der Cluster konnte auf Basis seines aus der Heatmap ersichtlichen Phänotyps einer der bekannten B-Zell Populationen zugeordnet werden. Interessanterweise wurden einige der Zellcluster nach ihrer CD73 Expression aufgeteilt. Dies trifft beispielsweise auf reife Naive B-Zellen zu, die verschiedenen Clustern zugeordnet wurden, welche sich im erstellten minimalen Spannbaum in CD73<sup>+</sup> MatNa und CD73<sup>-</sup> MatNa aufteilen ließen. Der minimale Spannbaum verbindet benachbarte Cluster nach Ähnlichkeit und setzt die gefundenen Cluster so in Beziehung. Spannenderweise wurden die Cluster 2, 9 und 23 zwischen CD73<sup>+</sup> MatNa und CD73<sup>-</sup> MatNa gesetzt. Hierbei handelt es sich um unreife transitionale Zellen. Während IgM Mem Zellen neben CD73<sup>-</sup> MatNa Zellen angeordnet wurden, folgten auf der Gegenseite klassengewechselte B-Zellen und Plasmablasten auf CD73<sup>+</sup> MatNa (s. Abb. 24).

Die Entwicklung von IgM Mem Zellen ist gegenwärtig noch Gegenstand von Diskussionen. Es konnte gezeigt werden, dass humane transitionale B-Zellen aus Nabelschnurblut bei Stimulation mit einem Toll-like-Rezeptor-9 (TLR-9) Liganden *in vitro* zu IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen differenzierten. Entsprechend wird vermutet, dass dieser Prozess in der Milz T-Zell- und keimzentrumsunabhängig zur Entwicklung von IgM<sup>+</sup> Gedächtniszellen aus TransB führen könnte (Capolunghi et al. 2008). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte später, dass die *in vitro* Stimulation der Toll-like-Rezeptoren von transitionalen B-Zellen zu somatischer Hypermutation führt, was die in der Einleitung erwähnten vorhanden bcl-6 Mutationen dieser Zellen erklären könnte (Aranburu et al. 2010). Entsprechend wird vermutet, dass IgM<sup>+</sup> Memory B-Zellen extrafollikuläre T-Zell-unabhängige Immunantworten vermitteln können (nach Capolunghi et al. 2013).

Wie oben beschrieben konnten Capolunghi et al. unreife TransB aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen T-Zell-unabhängig zur Entwicklung zu IgM Mem Zellen stimulieren (Capolunghi et al. 2008). Dass diese Zellen gleichzeitig CD73<sup>-</sup> sind, konnte durch Pettengill und Levy gezeigt werden (Pettengill und Levy 2016). Die Literatur liefert also Hinweise auf einen Ursprung von IgM Mem Zellen aus CD73<sup>-</sup> B-Zellen, was exakt zum Aufbau des hier gezeigten minimalen Spannbaums passt. Somit unterstützt der vom SPADE Algorithmus objektiv erstellte Spannbaum die These, dass IgM Mem Zellen von CD73<sup>-</sup> B-Zellen abstammen könnten.

## **6. Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Arbeit habe ich zunächst ein Färbeschema (Panel) für die durchflusszytometrische Differenzierung von B-Zell Subpopulationen für den Gebrauch in der immunologischen Diagnostik erstellt. Teil dieses Panels war der Marker CD73, dessen Expressionsmuster auf B-Zell-Populationen und dessen Funktion auf B-Zellen bisher noch unklar sind. Dieses Panel wurde anschließend genutzt, um die Expression von CD73 im Verlauf der peripheren B-Zell-Differenzierung zu untersuchen, und um anhand verschiedener Patientenkohorten den Wert von CD73 als diagnostischen Marker bei der Beurteilung der B-Zell-Reifung festzustellen. Die Analyse von CD73 auf B-Zellen von HIV Patienten zeigte, dass HIV Patienten weniger CD73 auf ihren B-Zellen exprimierten als gesunde Spender. Diese Patienten zeigten darüber hinaus ähnliche Veränderungen in der Zusammensetzung ihrer B-Zellen wie COVID Patienten. Dies drückte sich unter anderem in einer relativen Vermehrung der naiven auf Kosten der klassengewechselten B-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern aus. Diese Ergebnisse konnten wir gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Schulze zur Wiesch vertiefen und so einen Zusammenhang zwischen der verminderten CD73 Expression auf B-Zellen von HIV Patienten mit der verminderten Fähigkeit dieser Zellen zum Klassenwechsel in-vitro aufzeigen (Kim et al. 2017).

Des Weiteren habe ich untersucht, wie die CD73 Expression einer B-Zelle vom Lebensalter des Spenders und dem Differenzierungsgrad der B-Zelle abhängt. Ich konnte zeigen, dass die CD73 Expression auf B-Zellen bis zum jungen Erwachsenenalter zunimmt, um dann mit steigendem Alter wieder abzunehmen. Die maximale Expression findet auf reifen Naiven Zellen statt, während Zellpopulationen im Blut, die einen Antigenkontakt hatten, wieder deutlich weniger CD73 exprimieren. Außerdem konnte ich zeigen, dass unreife B-Zellen kaum CD73 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Beobachtungen nahmen wir zum Anlass, die CD73 Expression unreifer B-Zellpopulationen detaillierter zu untersuchen. Während unreifere T1 und T2 transitionale B-Zellen noch kein CD73 exprimierten, konnte ich mit Hilfe von CD73 eine dritte Reifestufe von transitionalen B-Zellen identifizieren. Meine Daten legen nahe, dass T3 Zellen eine Zwischenstufe der Ausdifferenzierung von transitionalen zu reifen Naiven B-Zellen sein könnten. Diese These konnte ich durch die Erstellung eines minimalen Spannbaums mit SPADE weiter unterstützen. Trotzdem stützt sich diese Analyse bisher nur auf phänotypische Daten und sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

Zusammenfassend deuten meine Daten darauf hin, dass das Ektoenzym CD73 tatsächlich eine wichtige Rolle für die Reifung und Funktion von B-Lymphozyten spielt.

## 7. Summary

In this work I developed a panel for the flow-cytometric analysis of B lymphocyte subpopulations for the use in immunological diagnostics. The marker CD73, which expression levels on B cell subpopulations and role in B cell differentiation is not yet clear. This panel was used to monitor the expression of CD73 during peripheral B cell development and differentiation and to determine the diagnostic value of CD73 for evaluation of B cell maturation in different patient cohorts.

The analysis of CD73 on B cells of HIV patients revealed that B cells of HIV patients expressed lower levels of CD73 than those of healthy donors. The changes in the composition of their B cell pool resembled those previously seen in CVID patients. The peripheral B cell pool of HIV patients showed increased levels of naive and decreased levels of class-switched B cells for instance. These results were enlarged upon together with the workgroup of Schulze zur Wiesch. This work then revealed a correlation between the diminished CD73 expression and aggravated class-switching in-vitro of B cells of HIV patients (Kim et al. 2017).

Furthermore, I investigated the correlation between CD73 expression of B lymphocytes and the age of blood donors. I was able to show, that the expression of CD73 increases with age until early adulthood and decreases with further aging. The maximal expression of CD73 is found on mature naive cells, while cell populations in the blood, which had contact to antigens reduce their expression of CD73 with further differentiation. Additionally, we decided to investigate in CD73 expression of immature B cells, after I was able to show that these cells hardly express CD73 on their surface. While immature T1 and T2 transitional B cells did not express CD73 on their surface, we were able to describe a third maturation stage of transitional B cells based on their expression of CD73. My findings suggest that T3 cells could be an intermediate stage of maturation between immature transitional and mature naive B lymphocytes, which was underlined by further analysis using tSNE and SPADE. Nevertheless, this thesis is based on phenotypical data only up to now and should be pursued in the future.

In summary my findings suggest that the ectoenzyme CD73 indeed plays a crucial role for maturation and function of B lymphocytes in humans.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AID	Activation-induced cytidine deaminase
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART	HIV-positive, anti-retroviral therapierte Patienten
C-Region	Konstante Region
CD	Cluster of Differentiation
CD21low	CD21-gering exprimierende B-Zellen
CD27- Mem	CD27- Gedächtniszellen
CLPs	Gewöhnliche lymphoide Progenitorzellen
CVID	Chronisch-variable Immundefizienz
FoB-Zellen	Follikuläre B-Zellen
FDCs	Follikuläre dendritische Zellen
FSC	Forwardscatter
FSC-A	Forwardscatter-Fläche
FSC-H	Forwardscatter-Höhe
H-Kette	Schwere Kette (von Antikörpern)
HD	Gesunde Spender
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgD	Immunglobulin der Klasse D
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IgM Mem	IgM+IgD+CD27+ Gedächtniszellen
L-Kette	Leichte Kette (von Antikörpern)
MZ-B-Zellen	Marginalzonen-B-Zellen
MatNa clean	Reife naive B-Zellen ohne CD21low Zellen
MPPs	Multipotente myeloid/lymphoide Progenitorzellen
Naive	IgD+CD27- naive B-Zellen
pHSZs	Pluripotente hämatopoetische Stammzelle
pro-B	Progenitor B-Zellen
SHM	Somatische Hypermutation
SSC	Sidescatter
Sw Mem	IgD-CD27+ klassengewechselte Gedächtniszellen
T1	T1-transitionale Zellen
T2	T2-transitionale Zellen

T3	T3-transitionale Zellen
TransB	Transitionale B-Zellen
tSNE	t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding
Viremic	HIV-positive, nicht anti-retroviral therapierte Patienten

## 9. Literaturverzeichnis

- Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H. und Komiyama A. (2000) 'CD27: a memory B-cell marker.', *Immunology today*, 21(5):204–6.
- Apoil P. A., Puissant-Lubrano B., Congy-Jolivet N., Peres M., Tkaczuk J., Roubinet F. und Blancher A. (2017) 'Reference values for T, B and NK human lymphocyte subpopulations in adults', *Data in Brief*, 12:400–404.
- Aranburu A., Ceccarelli S., Giorda E., Lasorella R., Ballatore G. und Carsetti R. (2010) 'TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells.', *Journal of immunology*, 185(12):7293–301.
- Bažil V., Hilgert I., Křištofová H., Maurer D. und Hořelší V. (1989) 'Sialic acid-dependent epitopes of CD45 molecules of restricted cellular expression', *Immunogenetics*, 29(3):202–205.
- Bemark M. (2015) 'Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development.', *Journal of biomedical research*, 29(4):264–84.
- Bemark M., Friskopp L., Saghafian-Hedengren S., Koethe S., Fasth A., Abrahamsson J., Sverremark-Ekström E., Andersson B. A. und Mellgren K. (2013) 'A glycosylation-dependent CD45RB epitope defines previously unacknowledged CD27<sup>+</sup>IgM(high) B cell subpopulations enriched in young children and after hematopoietic stem cell transplantation.', *Clinical immunology*, 149(3):421–31.
- Berrón-Ruíz L., López-Herrera G., Ávalos-Martínez C. E., Valenzuela-Ponce C., Ramírez-SanJuan E., Santoyo-Sánchez G., Mújica Guzmán F., Espinosa-Rosales F. J. und Santos-Argumedo L. (2016) 'Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies', *Allergologia et Immunopathologia*, 44(6):571–579.
- Boss G. R., Thompson L. F., Spiegelberg H. L., Pichler W. J. und Seegmiller J. E. (1980) 'Age-dependency of lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity.', *Journal of immunology*, 125(2):679–82.
- Capolunghi F., Cascioli S., Giorda E., Rosado M. M., Plebani A., Auriti C., Seganti G., Zuntini R., Ferrari S., Cagliuso M., Quinti I. und Carsetti R. (2008) 'CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies.', *Journal of immunology*, 180(2):800–808.
- Capolunghi F., Rosado M. M., Sinibaldi M., Aranburu A. und Carsetti R. (2013) 'Why do we need IgM memory B cells?', *Immunology letters*, 152(2):114–20.

- Caraux A., Klein B., Paiva B., Bret C., Schmitz A., Fuhler G. M., Bos N. A., Johnsen H. E., Orfao A., Perez-Andres M. und Myeloma Stem Cell Network (2010) 'Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells.', *Haematologica*, 95(6):1016–20.
- Carsetti R., Rosado M. M. und Wardmann H. (2004) 'Peripheral development of B cells in mouse and man.', *Immunological reviews*, 197:179–91.
- Cekic C. und Linden J. (2016) 'Purinergic regulation of the immune system.', *Nature reviews. Immunology*, 16(3):177–92.
- Cuss A. K., Avery D. T., Cannons J. L., Yu L. J., Nichols K. E., Shaw P. J. und Tangye S. G. (2006) 'Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity.', *Journal of immunology*, 176(3):1506–16.
- De Silva N. S. und Klein U. (2015) 'Dynamics of B cells in germinal centres', *Nature Reviews Immunology*, 15(3):137–148.
- Edwards N. L., Magilavy D. B., Cassidy J. T. und Fox I. H. (1978) 'Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia.', *Science*, 201(4356):628–30.
- Gautreau G., Pejoski D., Le Grand R., Cosma A., Beignon A.-S. und Tchitchek N. (2017) 'SPADEVizR: an R package for visualization, analysis and integration of SPADE results.', *Bioinformatics*, 33(5):779–781.
- Jego G., Bataille R. und Pellat-Deceunynck C. (2001) 'Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts.', *Blood*, 97(6):1817–22.
- Johnson S. M., North M. E., Asherson G. L., Allsop J., Watts R. W. und Webster A. D. (1977) 'Lymphocyte purine 5'-nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinaemia.', *Lancet*, 1(8004):168–70.
- Kim E.-S. und Ackermann C., Toth I., Dierks P., Eberhard J. M., Wroblewski R., Scherg F., Geyer M., Schmidt R. E., Beisel C., Bockhorn M., Haag F., van Lunzen J. und Schulze Zur Wiesch J. (2017) 'Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression.', *Journal of leukocyte biology*, 101(5):1263-1271.
- Krijthe J. H. (2015) 'Rtsne: T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding using a Barnes-Hut Implementation', [Online im Internet] URL: <https://github.com/jkrijthe/Rtsne> [Stand: 24.02.2019, 18:15].
- Kurosaki T., Kometani K. und Ise W. (2015) 'Memory B cells', *Nature Reviews*

- Immunology, 15(3):149–159.
- Lee J., Kuchen S., Fischer R., Chang S. und Lipsky P. E. (2009) 'Identification and characterization of a human CD5<sup>+</sup> pre-naive B cell population.', *Journal of immunology*, 182(7):4116–4126.
- Linderman M., Qiu P., Simonds E. und Bjornson Z. (2018) 'SPADE -- An analysis and visualization tool for Flow Cytometry. R package version 1.10.4', [Online im Internet] URL: <https://rdr.io/github/olimora/mySPADE/> [Stand: 24.02.2019, 18:19].
- Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D (2014) *Der Experimentator - Immunologie*, 4. Auflage, Springer Spektrum, Berlin; Heidelberg, Seiten: 73-96.
- Melchers F. (2015) 'Checkpoints that control B cell development', *Journal of Clinical Investigation*, 125(6):2203–2210.
- Melzer S., Zachariae S., Bocsi J., Engel C., Löffler M. und Tárnok A. (2015) 'Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry', *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 88(4):270–281.
- Merino R., Ding L., Veis D. J., Korsmeyer S. J. und Nuñez G. (1994) 'Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes.', *The EMBO journal*, 13(3):683–691.
- Moir S. und Fauci A. S. (2013) 'Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals.', *Immunological reviews*, 254(1):207–24.
- Morbach H., Eichhorn E. M., Liese J. G. und Girschick H. J. (2010) 'Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood', *Clinical and Experimental Immunology*, 162(2):271–279.
- Murphy K., Weaver C. (2016) *Janeway's Immunobiology*, Ninth Edition, Garland Science: New York, New York, Seiten: 192-195, 296-302, 311, 399-421, 462-464, 473-485, 792, 793.
- Nikolova M., Carriere M., Jenabian M.-A., Limou S., Younas M., Kök A., Huë S., Seddiki N., Hulin A., Delaneau O., Schuitemaker H., Herbeck J. T., Mullins J. I., Muhtarova M., Bensussan A., Zagury J.-F., Lelievre J.-D. und Lévy Y. (2011) 'CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression.', *PLoS pathogens*, 7(7):e1002110.
- Nutt S. L., Hodgkin P. D., Tarlinton D. M. und Corcoran L. M. (2015) 'The generation of antibody-secreting plasma cells.', *Nature reviews. Immunology*, 15(3):160-71.
- Palanichamy A., Barnard J., Zheng B., Owen T., Quach T., Looney R. J., Sanz I. und Anolik J. H. (2009) 'Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy', *New York*, 182(10):5982–5993.

- Pettengill M. A. und Levy O. (2016) 'Circulating Human Neonatal Naïve B Cells are Deficient in CD73 Impairing Purine Salvage', *Frontiers in Immunology*, 7(MAR):1–9.
- Pieper K., Grimbacher B. und Eibel H. (2013) 'B-cell biology and development', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4):959–971.
- Piqueras B., Lavenu-Bombled C., Galicier L., Bergeron-van der Cruyssen F., Mouthon L., Chevret S., Debré P., Schmitt C. und Oksenhendler E. (2003) 'Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects.', *Journal of clinical immunology*, 23(5):385–400.
- Qiu P., Simonds E. F., Bendall S. C., Gibbs K. D., Bruggner R. V, Linderman M. D., Sachs K., Nolan G. P. und Plevritis S. K. (2011) 'Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE', *Nature Biotechnology*:886–891.
- R Core Team (2014) 'R: A language and environment for statistical computing', [Online im Internet.] URL: <http://www.R-project.org/> [Stand: 24.02.2019, 18:33].
- Saze Z., Schuler P., Hong C. und Cheng D. (2013) 'Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells', *Blood*, 122(July):9–19.
- Schena F., Volpi S., Faliti C., Penco F., Santi S., Proietti M., Schenk U., Damonte G., Salis A., Bellotti M., Fais F., Tenca C., Gattorno M., Eibel H., Rizzi M., Warnatz K., Idzko M., Ayata C. K., Rakhmanov M., Galli T., Martini A., Canossa M., Grassi F. und Traggiai E. (2013) 'Dependence of Immunoglobulin Class Switch Recombination in B Cells on Vesicular Release of ATP and CD73 Ectonucleotidase Activity', *Cell Reports*, 3(6):1824–1831.
- Seifert M. und Küppers R. (2016) 'Human memory B cells.', *Leukemia*, 30(12):2283–2292.
- Shi Y., Agematsu K., Ochs H. D. und Sugane K. (2003) 'Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM.', *Clinical immunology*, 108(2):128–37.
- Sims G. P., Ettinger R., Shirota Y., Yarboro C. H., Illei G. G. und Lipsky P. E. (2005) 'Identification and characterization of circulating human transitional B cells', *Blood*, 105(11):4390–4398.
- Suryani S., Fulcher D. A., Santner-Nanan B., Nanan R., Wong M., Shaw P. J., Gibson J., Williams A. und Tangye S. G. (2009) 'Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells.', *Blood*, 115(3):519–29.
- Taylor J. J., Pape K. A., Steach H. R. und Jenkins M. K. (2015) 'Humoral immunity.

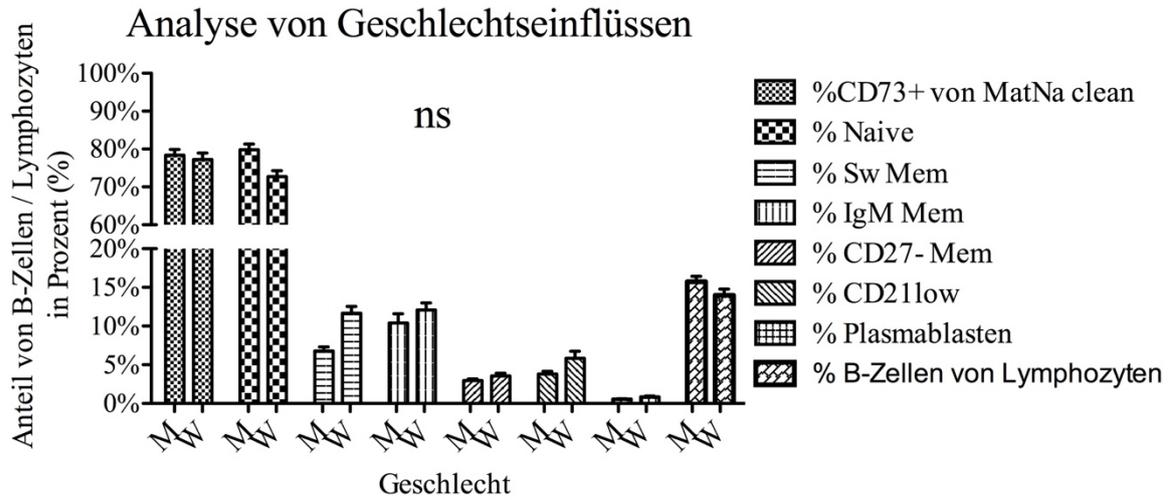
- Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell.’, *Science*, 347(6223):784–7.
- Thorarinsdottir K., Camponeschi A., Gjertsson I. und Mårtensson I.-L. (2015) ‘CD21<sup>-</sup>/low B cells: A snapshot of a unique B-cell subset in health and disease’, *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(3):254-61.
- Van der Maaten L. (2014) ‘Accelerating t-SNE using Tree-Based Algorithms’, *Journal of Machine Learning Research*, 15:3221–3245.
- Van Der Maaten L. und Hinton G. E. (2008) ‘Visualizing high-dimensional data using t-sne’, *Journal of Machine Learning Research*, 9:2579–2605.
- Vásquez C., Franco M. A. und Angel J. (2015) ‘Rapid Proliferation and Differentiation of a Subset of Circulating IgM Memory B Cells to a CpG/Cytokine Stimulus In Vitro.’, *PloS one*, 10(10):e0139718
- Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., Eibel H., Schlesier M. und Peter H. H. (2002) ‘Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease.’, *Blood*, 99(5):1544–51.
- Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E., Vlkova M., Hernandez M., Detkova D., Bos P. R., Poerksen G., von Bernuth H., Baumann U., Goldacker S., Gutenberger S., Schlesier M., Bergeron-van der Cruyssen F., Le Garff M., Debre P., Jacobs R., Jones J., Bateman E., Litzman J., van Hagen P. M., Plebani A., Schmidt R. E., Thon V., Quinti I., Espanol T., Webster A. D., Chapel H., Vihinen M., Oksenhendler E., Peter H. H. und Warnatz K. (2007) ‘The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency’, *Blood*, 111(1):77–85.
- Weller S., Braun M. C., Tan B. K., Rosenwald A., Cordier C., Conley M. E., Plebani A., Kumararatne D. S., Bonnet D., Tournilhac O., Tchernia G., Steiniger B., Staudt L. M., Casanova J.-L., Reynaud C.-A. und Weill J.-C. (2004) ‘Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire.’, *Blood*, 104(12):3647–54.
- Wirhth S. und Lanzavecchia A. (2005) ‘ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells’, *Blood*, 106(12):3433-41.
- Wu Y.-C. B., Kipling D. und Dunn-Walters D. K. (2011) ‘The Relationship between CD27 Negative and Positive B Cell Populations in Human Peripheral Blood’, *Frontiers in Immunology*, 2(DEC):1–12.

### **Anmerkung zur Zitierweise**

Die im Fließtext mit der Formulierung ‚**nach** Autor (Jahr)‘ gekennzeichneten Zitate beziehen sich auf Übersichtsarbeiten.

## 10. Anhang

### 10.1 Zusätzliche Abbildungen



**Abbildung 25 : Analyse von Geschlechtseinflüssen**

Die Anteile unterschiedlicher B-Zell Subpopulationen von Gesamt-B-Zellen innerhalb der Pat-Kohorte wurden aufgeteilt nach Geschlechtern (männlich (M), weiblich (W)) gezeigt

## **11. Danksagung und Widmung**

**Herzlichen Dank an...**

...**meine Eltern**, denen ich diese Arbeit widme.

...**das Institut für Immunologie und seine Mitarbeiter**. Die familiäre Atmosphäre dort machte ein produktives Arbeiten erst möglich.

...**Prof. Dr. med. Friedrich Haag**, der als Betreuer und Doktorvater immer ein offenes Ohr hatte und mir viele Kongressbesuche und Erfahrungen ermöglichte.

...**Gudrun Dubberke**, die mich geduldig in labortechnische Methoden einwies und mich immer unterstützt hat.

...**Dr. rer. nat. Stephan Menzel**, der zwar nicht offiziell mein Betreuer war, sich aber trotzdem so verhielt und mir immer half, wenn ich nicht weiterkam.

...die **Mitarbeiter der AG Haag**, die mir sehr oft spontan geholfen haben und ein Arbeiten in entspannter Atmosphäre ermöglicht haben.

...die **Mitarbeiter des Diagnostiklabors**, die mir häufig mit Messungen geholfen haben und mir die Geräte des Labors zur Verfügung stellten.

...die **AG Mittrücker** und ihre Mitarbeiter, insbesondere **Prof. Dr. rer. nat. Hans-Willi Mittrücker**, der mir häufig spontan weiterhalf und Inhalte erklärte.

...die **AG Tolosa** und ihre Mitarbeiter, die uns oft mit fachlichen Fragen und Materialien half. Ich danke insbesondere **Laura Glau** für ihre Hilfe bei den SPADE und tSNE Analysen und **Dr. rer. nat. Anne Rissiek**, die immer ein offenes Ohr hatte und mir viele fachliche Fragen rund um das Thema FACS beantwortet hat.

...die **AG Nolte** und ihre Mitarbeiter, deren technische Assistentinnen und Mitarbeiter ich so manches mal auf der Suche nach Antikörpern behelligt habe. Ich danke insbesondere **Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte**, der meine Arbeit mit kritischem Hinterfragen und seinem Fachwissen vorangebracht hat.

...**Priv.-Doz. Dr. med. Julian Schulze zur Wiesch** und die **Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe**. Ich danke nicht nur für die fachliche Zusammenarbeit, sondern auch für viele Ratschläge und die Bereitschaft zur Beurteilung dieser Arbeit.

## 12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Ort, Datum: .....

Unterschrift: .....

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....